

IAP20 Rec'd PCT/PTO 31 JAN 2006

### Verfahren zur Herstellung zyklischer Moleküle

Auf der Suche nach neuen Medikamenten geraten Naturprodukte  
5 zunehmend in den Fokus der Wissenschaft und dienen ihr als  
Leitstruktur für die Entwicklung neuer Wirkstoffe. Diese  
pharmakologisch relevanten Moleküle werden von Bakterien oder  
Pilzen synthetisiert, und ihr Wirkungsspektrum reicht von  
- antibiotischen (Infektionskrankheiten) über  
10 - zytostatischen (Krebs) bis zu  
- immunsuppressiven (Organtransplantation) Eigenschaften.  
Die Synthese dieser kleinen Moleküle erfolgt in der Natur  
meist an großen Multienzymen, die hauptsächlich Peptide,  
Polyketide oder ein Hybrid aus beiden herstellen. Prominente  
15 Beispiele für solche Verbindungen sind Penicillin, Cepha-  
losporin, Daptomycin, Epothilon und Cyclosporin, die zum Teil  
schon seit langer Zeit erfolgreich in der Medizin eingesetzt  
werden. Eine gemeinsame Eigenschaft dieser Verbindungen ist  
die zyklische Struktur, die für die biologische Aktivität  
20 entscheidend ist. Viele der oben genannten Verbindungen  
besitzen keine oder eine stark verminderte Wirksamkeit, wenn  
sie linear vorliegen. Im Gegensatz zu linearen Molekülen ist  
bei zyklischen Molekülen die konformatorische Flexibilität  
(die freie Bewegung und Rotation) durch den Ringschluss  
25 vermindert, was nur die biologisch aktive Form in Erscheinung  
treten lässt. Die Natur hat hier eine interessante Strategie  
gewählt, die sicherstellt, dass das synthetisierte Molekül in  
nur einer Modifikation vorkommt und daher spezifisch mit nur  
einem „Target“ (Angriffsziel) im biologischen System inter-  
30 agiert. Angriffsziele sind meistens essentielle Bestandteile  
oder Funktionen einer Zelle, die für ihr Überleben wichtig  
sind, wie z.B. die Zellwand oder die Proteinsynthese. Da

diese Moleküle selektiv bakterielle, fungale oder cancerogene (Krebs-) Zellen bzw. Viren eliminieren und gleichzeitig körpereigenes Zellgewebe verschonen, sind sie in der Therapie von Infektionskrankheiten und Krebs von enormer Bedeutung.

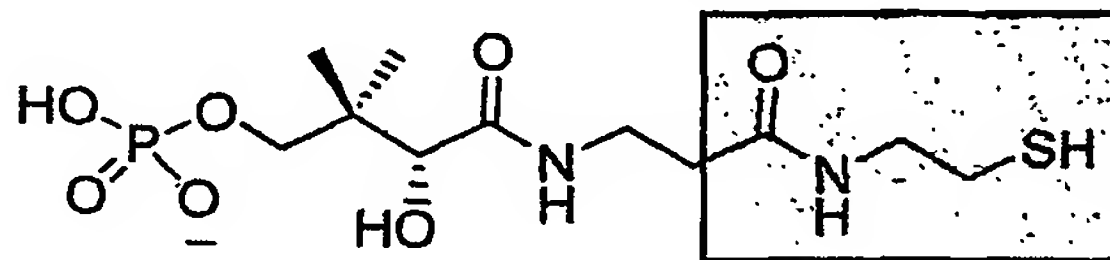
5 Daneben können sie auch die von T-Zellen verursachte Immunabwehr unterdrücken, was die Organabstoßung bei Transplantationen wirksam verhindert (Cyclosporin).

Durch den intensiven Einsatz in der Medizin haben aber leider viele dieser Verbindungen ihre Wirksamkeit verloren, da die  
10 zu bekämpfenden Systeme Resistenzmechanismen entwickelt haben. Darüber hinaus besitzen viele potente Wirkstoffe sehr starke Nebenwirkungen, was ihren medizinischen Einsatz einschränkt (z.B. Nierentoxizität von Bacitracin). Daher besteht ein großer Bedarf an neuen bzw. optimierten Chemotherapeutika  
15 (Antibiotika, Cytostatika und Immunsuppressiva), die möglichst wenige Nebenwirkungen aufweisen und hoch spezifisch mit ihrem „Target“ interagieren. Für die Identifizierung solcher neuen Wirkstoffe können die bereits bekannten, potenten zyklischen Naturprodukte als Leitstruktur dienen und  
20 systematisch verändert und auf verbesserte Wirksamkeit getestet werden.

Derartige Naturstoffe werden im biologischen System von nicht ribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) hergestellt und von sogenannten Thioesterasen/Zyklasen zyklisiert, die sich in  
25 guter Ausbeute rekombinant *in vitro* überproduzieren lassen. Diese Enzyme können zuverlässig und effizient lineare Peptide einer bestimmten Leitstruktur in zyklische Moleküle überführen. Die Triebkraft der Zyklisierungsreaktion im natürlichen System ist die Aktivierung des C-Terminus (d. h. der freien  
30 Carbonsäure des linearen Peptids) durch eine Thioesterabgangsgruppe, dem Kofaktor Phosphopantethein. Im artifiziellen System wird die rekombinante Zyklase mit einem verkürzten Thioester-Mimic dieses natürlichen Kofaktors umgesetzt (N-

Acetylcysteamin, SNAC). Unter verkürzten Thioester-Mimics sind dabei Substanzen zu verstehen, die

- die Funktion des natürlichen Kofaktors imitieren, aber nicht natürlichen Ursprungs sind,
- 5 - eine Thio-Abgangsgruppe besitzen und
- deren aliphatische Kette kürzer ist als die des natürlichen Kofaktors Phosphopantethein.



Phosphopantethein und SNAC (markiert)

10

Mit der SNAC-Abgangsgruppe konnten bisher die Tyrocidin- und Surfactin- Zyklasten charakterisiert werden. Viele andere biologisch relevante zyklische Verbindungen, wie z.B. Fengycin, Mycosubtilin, Syringomycin und Bacitracin zeigen bei Verwendung der SNAC-Abgangsgruppe keine Zyklisierungsaktivität mit dem jeweiligen Enzym, was mit einer inkorrekten Faltung des Enzyms erklärt wird. Andere Verbindungen, wie z.B. CDA (Calcium dependent antibiotic) und Bacillibactin zeigen zum Teil sehr schlechten Umsatz mit den bekannten Substratanaloga.

15

20

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind nicht natürliche, synthetische Kofaktoren, deren chemische Abgangsgruppenqualitäten für eine effiziente Enzymacylierung sorgen. Entgegen der allgemein in der Fachwelt verbreiteten Annahme findet keine „Erkennung“ des natürlichen Kofaktors Panthethein durch das Enzym statt, weshalb einzig das chemische Übertragungspotenzial des Acylrestes auf das aktive Zentrum im Enzym die entscheidende Größe ist. Die in der Fachwelt verbreitete Annahme, die „Erkennung“ des natürlichen Kofaktors Panthethein durch das Enzym sei der Ausschlag gebende Faktor für

25

30

die Zyklisierungsreaktion, ist beispielsweise dargestellt in  
*JW Trauger, RM Kohli, HD Mootz, MA Marahiel and CT Walsh,*  
*Nature 2000, 407: 215-218; R Aggarwal, P Caffrey, PF Leadly,*  
*CJ Smith and J Staunton, Journal of the Chemical Society*  
5 *Communications 1995, 15: 1519-1520* sowie *RS Gokhale, D Hunzi-*  
*ker, DE Cane and C Khosla, Chemical Biology 1999, 6: 117-125.*

Im Gegensatz zu den etablierten SNAC-Substraten weist z.B.  
Thiophenol als erfindungsgemäße ladungsstabilisierte Abgangs-  
10 gruppe keinerlei strukturelle Ähnlichkeit mit dem natürlichen  
Kofaktor auf, besitzt aber eine deutlich bessere Abgangsgrup-  
penqualität, da sich das Thiol in Konjugation mit einem  
aromatischen Benzolring befindet. Bei anderen erfindungsgemä-  
ßen Abgangsgruppen befindet sich die Thiol- oder Hydroxyfunk-  
15 tion an einem  $sp^3$ -Kohlenstoffatom, das direkt an den aromati-  
schen Ring gebunden ist ( $\alpha$ -C-Atom), so dass das aromatische  
System einen induktiven Effekt auf die Thio- oder Hydro-  
xygruppe ausübt. Derartige erfindungsgemäße Abgangsgruppen  
werden nachfolgend als araliphatische Thio- oder Hydroxy-  
20 Abgangsgruppen bezeichnet. Dem Fachmann ist bekannt, dass  
sich der induktive Effekt eines aromatisches System stabili-  
sierend auf die an ein  $\alpha$ -C-Atom gebundenen Gruppen auswirkt  
und damit ihre Abgangsgruppenqualität erhöht. Dies kann z.B.  
in *Michael B. Smith & Jerry March: March's Advanced Organic*  
25 *Chemistry. Reactions, Mechanisms, and Structure. 5th Edition*  
*2000, John Wiley & Sons Inc., New York / Chichester / Brisba-*  
*ne / Toronto / Singapore* nachgeschlagen werden. Im Falle des  
SNACs ist weder eine Konjugation mit einem aromatischen oder  
heteroaromatischen System noch eine Stabilisierung durch den  
30 induktiven Effekt eines aromatischen Systems in  $\alpha$ -Stellung  
zum Kohlenstoffatom, an das die Thiogruppe gebunden ist,  
vorhanden, weshalb viele Enzyme keine Aktivität mit diesen  
Substraten zeigen oder niedrige  $k_{cat}/K_M$  Werte aufweisen.

**[Beschreibung und Stand der Technik]**

Viele wertvolle Pharmazeutika besitzen zyklische Strukturen, wobei die Ringe dieser zyklischen Strukturen aus 5 oder mehr Atomen gebildet sind. Die aus dem Stand der Technik bekannten Methoden der synthetischen Chemie zur Darstellung zyklischer Verbindungen weisen zahlreiche Nachteile auf. Zu diesen Nachteilen gehören beispielsweise, aber nicht ausschließlich, geringe Ausbeuten der zyklischen Produkte, die Notwendigkeit von Schutzgruppen, um reaktive funktionelle Gruppen zu blockieren oder zu schützen, sowie die Notwendigkeit, diese Reaktionen in organischen Lösungsmitteln durchzuführen. Diese synthetischen Probleme können durch enzymatische Verfahren überwunden werden.

Die EP 0 832 096 B1 beschreibt ein Verfahren, mit dem ein nicht oxidiertes N-terminales Cystein eines ersten Oligopeptids mit dem C-terminalen Thioester eines zweiten Oligopeptids umgesetzt wird. Die Reaktion wird durch ein Thiol katalysiert, wobei die Thiogruppe direkt an einen aromatischen oder heteroaromatischen Ring gebunden ist. Dabei bildet sich ein  $\beta$ -Aminothioester als Zwischenprodukt, der sich spontan intramolekular umlagert, wobei die Amidbindung des Ligationsproduktes der beiden Oligopeptide entsteht. Nachteilig bei diesem Verfahren ist, dass das erste Oligopeptid zwingend ein N-terminales Cystein besitzen muss und dass es nicht für Zyklisierungsreaktionen geeignet ist.

Dagegen beschreibt die US 6,307,018 B1 eine allgemeine Methode, um ein erstes C-terminales  $\alpha$ -Thioesterpeptid mit einem zweiten N-terminalen Aminosäure-Peptidsegment zu verbinden, bei der das N-terminale Aminosäure-Peptidsegment kein N-terminales Cystein besitzen muss. Allerdings muss das zweite Oligopeptid eine sekundäre Aminogruppe aufweisen, die über das N-Atom dieser sekundären Aminogruppe an eine nicht oxidierte Sulfhydrylgruppe eines aromatischen Thiols gebunden ist. Bei dem aromatischen Thiol kann es sich um Thiophenol,



Benzylmercaptan oder ein S-Alkylbenzylmercaptan handeln.  
Darüberhinaus ist bei der US 6,307,018 B1 nachteilig, dass  
entweder der C-Terminus des ersten oder der N-Terminus des  
zweiten Oligopeptids Glycin sein muss. Die Methode ist nicht  
5 für die Zyklisierung von Peptiden geeignet.

Die US 2002/0192773 A1 beschreibt ein Verfahren zur enzymati-  
schen Herstellung makrozyklischer Moleküle, bei dem rekombi-  
nante Thioesterase-Domänen (TE-Domänen, Zyklasen) aus einem  
PKS- oder NRPS-Multidomänensystem mit einem Substrat umge-  
10 setzt werden, wobei das Substrat einen über eine Thioesterab-  
gangsgruppe aktivierten Acylrest und ein anhängendes Nucle-  
ophil enthält. Aktivierter Acylrest und Nucleophil sind über  
ein lineares Rückgrat voneinander getrennt. Nachteilig hier-  
bei ist, dass die Abgangsgruppe nicht ladungsstabilisiert  
15 ist.

Durch eine unzureichende Zyklisierungsaktivität vieler Enzyme  
bei Verwendung strukturell analoger Abgangsgruppen zum natür-  
lichen Kofaktor wie beispielsweise Coenzym A, Phosphopan-  
20 tethein und N-Acylcysteamin sind TE-Domänen in ihrer Anwen-  
dung jedoch stark limitiert. Die vorliegende Erfindung über-  
windet durch den Einsatz neuartiger Abgangsgruppen diese  
Einschränkung und ermöglicht nun die Erstellung von diversen  
zyklischen Wirkstoffbibliotheken vieler pharmakologisch  
25 bedeutender Molekülklassen.

Überraschend und im Widerspruch zum Stand der Technik wurde  
gefunden, dass die Erkennung der Substrate durch Enzyme bei  
der Zyklisierung von Peptiden und Proteinen keine Rolle  
spielt und dass ladungsstabilisierte Thio- und Hydroxyverbin-  
30 dungen gute Abgangsgruppen für die Acylierungsreaktion von  
Peptidzyklasen darstellen. Unter ladungsstabilisierten Thio-  
und Hydroxyverbindungen werden dabei aromatische oder hetero-  
aromatische Ringsysteme verstanden, bei denen eine Hydroxy-

oder Thiogruppe an eines der Ringatome oder an ein an das Ringsystem gebundenes Kohlenstoffatom gebunden ist.

Die vorliegende Erfindung stellt Substrate bereit, mit deren Hilfe die enzymatische Zyklisierung von solchen Peptiden und Proteinen möglich ist, die nach dem Stand der Technik nicht der Zyklisierung zugänglich waren. Des weiteren kann die Ausbeute von Proteinen und Peptiden, die mit Methoden des Standes der Technik zyklisiert werden können, mit Hilfe der erfindungsgemäßen Substrate gesteigert werden. Darüber hinaus liefert die vorliegende Erfindung ein Verfahren, um weitere an der Zyklisierung von Peptiden und Proteinen beteiligte Substrate chemisch zu verändern und damit der Zyklisierung leichter zugänglich zu machen.

15

#### [Aufgabe der Erfindung]

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, das Verfahren zur Darstellung zyklischer Peptide durch Umsetzung linearer Peptide mit Peptidzyklasen zu verbessern, wobei unter Verbesserung eine Erhöhung der Ausbeute an zyklischem Peptid und / oder eine Beschleunigung der Zyklisierungsreaktion und / oder eine Zyklisierung von mit bisherigen Verfahren nicht zyklisierbaren Peptiden verstanden wird. Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren zur Herstellung zyklischer Peptide, bei dem eine Peptidzyklase mit einem linearen Peptid in Kontakt gebracht wird, das lineare Peptid einen Acylrest enthält, der durch eine chemisch mit diesem Acylrest verbundene nucleophile Abgangsgruppe aktiviert ist, der aktivierte Acylrest des linearen Peptids das Zentrum der Peptidzyklase selektiv acyliert, wobei die nucleophile Abgangsgruppe unter Bildung des zyklischen Peptids abgespalten wird und zyklische Peptide mit Ringen aus mindestens 5 Atomen gebildet werden, wobei die nucleophile Abgangsgruppe, die mit dem Acylrest des linearen Peptids chemisch verbunden ist und

diesen aktiviert, ladungsstabilisiert ist und die ladungsstabilisierte Abgangsgruppe an die Acylgruppe der C-terminalen Carbonsäure des Peptids gebunden ist. Unter „Substraten“ werden hierbei lineare Peptide verstanden, an die eine nucleophile, ladungsstabilisierte erfindungsgemäße Abgangsgruppe chemisch gebunden ist. Unter ladungsstabilisierten Thio- und Hydroxyverbindungen werden dabei aromatische oder heteroaromatische Ringsysteme verstanden, bei denen eine Hydroxy- oder Thiogruppe an eines der Ringatome gebunden ist oder an ein Kohlenstoffatom, welches mit dem Ringsystem verbunden ist, wobei die chemische Struktur des aromatischen oder heteroaromatischen Systems so gewählt ist, dass eine an der Thio- oder Hydroxygruppe auftretende negative Ladung stabilisiert wird. Das erfindungsgemäße Verfahren führt zu höheren Ausbeuten an zyklischen Peptiden und / oder verbessert ihre Ausbeute und ermöglicht es erstmalig, auch Peptide wie Fengycin, Mycosubtilin, Syringomycin und Bacitracin zu zyklisieren, die mit den Methoden des Standes der Technik nicht zyklisierbar sind.

Die Bereitstellung der erfindungsgemäßen Substrate erfolgt durch die Synthese des linearen Peptids mit Hilfe von dem Fachmann bekannten Standardmethoden der Festphasenpeptidsynthese, darauf folgende Kupplung der freien Carbonsäure des linearen Peptids (freie Peptidsäure) an die erfindungsgemäße Thiol- oder Hydroxy-Abgangsgruppe, optionale Reinigung des so erhaltenen erfindungsgemäßen Substrates, darauf folgende Umsetzung des so erhaltenen erfindungsgemäßen Substrates mit einer Peptid-Zyklase und Reinigung des auf diese Weise erhaltenen zyklischen Peptids.

30

Dazu werden 1 Äquivalent (eq) der freien Peptidsäure mit 2 eq Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), 2 eq N-Hydroxybenzotriazol (HOBt) und 10 eq der jeweiligen Abgangsgruppe versetzt und in THF für 30 min gerührt. Nach Zugabe von 0,5 eq Kaliumkarbonat



wird die Reaktion für weitere 2,5 h agitiert und darauf  
filtriert, um ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff (DCH)  
abzutrennen. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer  
entfernt und das Peptid mit 95 % Trifluoressigsäure (TFA),  
5 2,5 % Wasser und 2,5 % Triisopropylsilan für 3 h entschützt.  
Das Reaktionsgemisch wird darauf in eiskalten Diethylether  
gegeben, worauf das Substrat präzipitiert. Dieser Schritt  
stellt eine Reinigung dar, bei der Reaktionsnebenprodukte  
abgetrennt werden, und führt zu einer Reinheit des Substrates  
10 von bis zu 80%, was im Allgemeinen für die weitere Umsetzung  
des Substrates mit einer Peptidzyklase ausreichend ist.  
Optional kann die Reinheit des Substrat anschließend mittels  
präparativer HPLC erhöht werden.

Enthält das lineare Peptid neben der C-terminalen freien  
15 COOH-Gruppe weitere freie COOH-Gruppen innerhalb der Peptid-  
kette, wie beispielsweise COOH-Gruppen von Glutaminsäure und  
/ oder Asparaginsäure, so müssen diese nicht C-terminalen  
freien COOH-Gruppen vor der Umsetzung des linearen Peptids  
mit einem Aktivierungsreagenz mit einer geeigneten orthogona-  
20 len Schutzgruppe geschützt werden, die nach Darstellung des  
erfindungsgemäßen Substrates wieder abgespalten werden muss.  
Geeignete Schutzgruppen und geeignete Methoden zu deren  
Entfernung sind dem Fachmann bekannt und können beispielswei-  
se in Theodora W. Greene and Peter G. M. Wuts, „Protective  
25 groups in organic synthesis“, 2<sup>nd</sup> Edition 1991, John Wiley &  
Sons Inc., New York / Chichester / Brisbane / Toronto /  
Singapore nachgeschlagen werden.

Das gereinigte Substrat mit der erfindungsgemäßen Abgangs-  
gruppe wird darauf mit der jeweiligen Peptidzyklase im Ver-  
30 hältnis 1 (Enzym) : 100 (Substrat) in 25 mM HEPES, 50 mM NaCl  
bei pH 7 und Raumtemperatur für 30-60 min inkubiert. Die  
Herstellung der HEPES-Lösung ist dem Fachmann bekannt und  
wurde in *J. Sambrook, E.F. Fritsch and T. Maniatis: Molecular  
Cloning: A Laboratory Manual Vol. I-III, Cold Spring Harbor*

*Laboratory Press*, 1982, beschrieben. Die Identifizierung und Quantifizierung des Reaktionsproduktes erfolgt mittels analytischer HPLC.

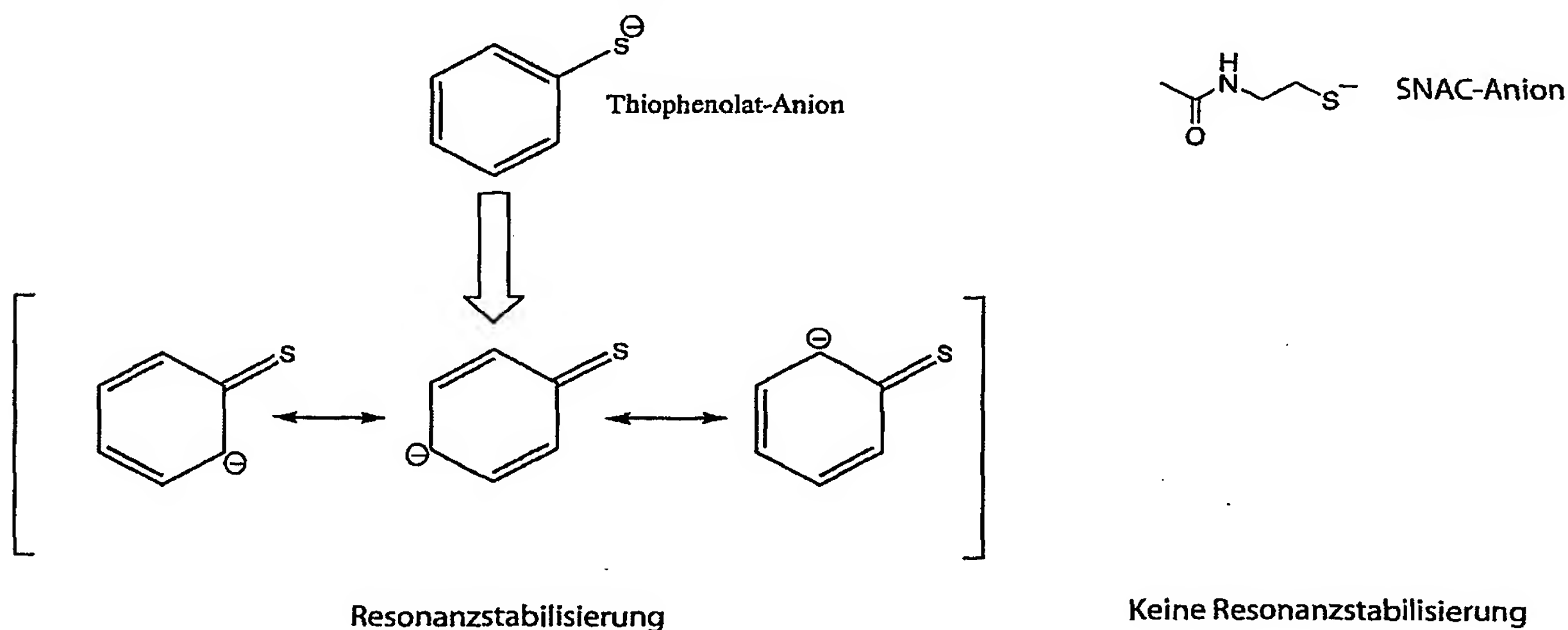
5 Alternativ zum Aktivierungsreagenz DCC lassen sich die erfindungsgemäßen Substrate auch durch Umsetzung der Peptidsäure mit der jeweiligen Abgangsgruppe in Gegenwart anderer, den C-Terminus der Peptidsäure aktivierenden Reagenzien umsetzen. Entsprechungen sind bekannt und können, ohne den Schutzbe-  
10 reich der Patentansprüche zu verlassen, verwendet werden. Hierzu zählen beispielsweise die dem Fachmann bekannten Aktivierungsreagenzien DCI, PyClop, HBTU, HATU, HOSu, TBTU, T3P, BopCl und 3-Cl-1-Pyridiniumiodid. Als Kupplungsadditive sind neben dem oben aufgeführten HOBt beispielsweise auch die  
15 dem Fachmann bekannten Substanzen HOAt und HONB verwendbar. Dem Fachmann ist bekannt, dass diese Reaktionen zweckmäßig unter Zugabe einer Base wie beispielsweise DIPEA durchgeführt werden. Dem Fachmann sind weiterhin verschiedene Lösungsmittel zur Verwendung in den genannten Verfahren bekannt. Er  
20 kann diese Kombinationen von Aktivierungsreagenzien, Kupplungsadditiven, Basen und Lösungsmitteln mit seinem üblichen Wissen und der Standardliteratur selbst herstellen.

Als ladungsstabilisierte Abgangsgruppen werden bei der vor-  
25 liegenden Erfindung chemische Verbindungen verstanden, die eine Thio- oder Hydroxyl-Gruppe besitzen und bei denen das freie Elektronenpaar des durch die Acylierungsreaktion freigesetzten Thiolat- oder Hydroxylat-Ions in Konjugation mit weiteren Elektronenpaaren von beispielsweise, aber nicht  
30 ausschließlich, C=C- oder C=N-Doppelbindungen steht oder bei der die Thio- oder Hydroxygruppe an ein Kohlenstoffatom gebunden ist, das seinerseits an einen aromatischen oder heteroaromatischen Ring gebunden ist. Solche Verbindungen sind z.B. Oxo- und Thio-aromatische und -heteroaromatische

Verbindungen, aber auch ladungsstabilisierte aliphatische Oxo- und Thio- Abgangsgruppen. Diese Abgangsgruppen, wie z.B. Thiophenol, Phenol, 2,3,4,5,6-Pentafluorphenol, die Mercapto-anisole und Thiokresole sowie 2-Hydroxypyridin und 2-Thio  
 5 pyridin funktionieren für die Acylierungsreaktion von Peptid-zyklasen, die keinerlei Ähnlichkeit mit dem natürlichen Kofaktor besitzen, und weisen verbesserte Eigenschaften für *in vitro* Zyklisierungsreaktionen auf.

10 Dies soll im Folgenden exemplarisch, aber nicht erschöpfend am Beispiel des Thiophenols erläutert werden:

Die Thiophenol-Abgangsgruppe weist bis auf die Thiolfunktion keine strukturelle Ähnlichkeit zum natürlichen 4'-Phospho-panthethein-Kofaktor auf. Die Thiolfunktion ist direkt an  
 15 einen aromatischen Phenylring gebunden. Dieses Strukturmerkmal verursacht die gegenüber den bisher beschriebenen Abgangsgruppen höhere Reaktivität dieser Verbindung. Beim nukleophilen Angriff des aktivierten Ser (= Serin) der katalytischen Triade im aktiven Zentrum des Enzyms wird diese  
 20 Abgangsgruppe als Thiophenolat-Ion freigesetzt. Die resultierende negative Ladung am Schwefelatom kann dabei sehr gut durch den angrenzenden Phenylring delokalisiert werden.



Eine derartige Erhöhung und Stabilisierung der Elektronendichte tritt bei den SNAC-, CoA- und Ppant-Abgangsgruppen nicht auf. Dort bleibt die negative Ladung am Schwefelatom lokalisiert. Da aber in der Regel die Güte einer Abgangsgruppe proportional zu ihrer chemischen Stabilisierung ist, sind  
5 SNAC-, CoA- und Ppant chemisch betrachtet schlechtere Abgangsgruppen als Thiophenol.

Dem Fachmann ist bekannt, dass das Austrittsvermögen und damit die Qualität einer Abgangsgruppe von der Fähigkeit der  
10 Abgangsgruppe abhängt, eine negative Ladung zu stabilisieren. Unter Stabilisierung einer Ladung versteht der Fachmann dabei das Verteilen von Ladungen oder Teilladungen auf mehrere Atome oder Bindungen, so dass diese Ladung oder Teilladung nicht an einem einzigen Atom oder an einer einzigen Bindung  
15 innerhalb eines Moleküls lokalisiert ist. Dabei sind dem Fachmann zwei verschiedene Möglichkeiten der Ladungsstabilisierung organischer Moleküle bekannt, die allgemein als mesomere oder Resonanz-Effekte (M-Effekte) und induktive Effekte (I-Effekte) bezeichnet werden. Unter einem mesomeren  
20 oder Resonanz-Effekt versteht der Fachmann das schnelle und reversible Verschieben von  $\pi$ -Elektronenpaaren, welches in Systemen auftritt, die konjugierte  $\pi$ -Bindungen besitzen. Dem Fachmann ist bekannt, dass der mesomere Effekt über große Entfernungen und damit viele Bindungen hinweg wirksam ist,  
25 wenn ein entsprechend ausgedehntes konjugiertes  $\pi$ -System vorliegt. In Ringverbindungen mit konjugierten  $\pi$ -Systemen nehmen auch Substituenten an der Mesomerie teil, sofern sie über freie  $\pi$ -Elektronenpaare verfügen oder diese aufnehmen können. Ist eine Ladung in einer substituierten Ringverbin-  
30 dung mit konjugiertem  $\pi$ -System und mesomeriefähigen Substituenten zu stabilisieren, so hängt es von der Position der Substituenten zueinander ab, ob und welche dieser Substituen-

ten tatsächlich an der Ladungsstabilisierung durch Mesomerie teilnehmen. Dies ist dem Fachmann bekannt.

Besitzt ein Atom eine höhere Elektronegativität und damit eine stärkere Anziehung auf die Bindungselektronen als sein

5 mit ihm über eine  $\sigma$ -Bindung verbundenes Nachbaratom, oder ist ein Atom mit weiteren Atomen oder Atomgruppen verbunden, die Elektronen ziehend wirken, so wird die Bindungselektronenwolke der hier betrachteten  $\sigma$ -Bindung in Richtung auf den Elektronenzug verschoben, d.h. polarisiert. Diese Polarisierung

10 einer  $\sigma$ -Bindung wird als Teilladung bezeichnet, da es sich hierbei um eine geringfügige Verschiebung von Elektronenwolken handelt und diese Verschiebung nicht zum Auftreten ganzzahliger Vielfacher der Elementarladung an einem bestimmten Atom führt. Die durch unterschiedliche Elektronegativitäten

15 und / oder unterschiedlichen Elektronenzug von Atomen und Atomgruppen hervor gerufene Polarisierung von  $\sigma$ -Bindungen wird vom Fachmann auch als induktiver Effekt bezeichnet. Dem Fachmann ist bekannt, dass der induktive Effekt für einander benachbarte Bindungen am größten ist und mit zunehmender

20 Entfernung zu dem Atom oder der Atomgruppe, das / die ihn hervor ruft, rasch abnimmt. Dies kann z.B. in *Michael B. Smith & Jerry March: March's Advanced Organic Chemistry. Reactions, Mechanisms, and Structure. 5th Edition 2000, John Wiley & Sons Inc., New York / Chichester / Brisbane / Toronto*

25 / *Singapore* nachgeschlagen werden.

Der Fachmann unterscheidet positive und negative mesomere bzw. induktive Effekte. Als positiv wird ein solcher Effekt bezeichnet, wenn er die Elektronendichte in Form einer Ladung oder Teilladung an einem Atom oder einer Atomgruppe erhöht

30 (+M-Effekt, +I-Effekt), als negativ, wenn er die Elektronendichte verringert (-M-Effekt, -I-Effekt). Befinden sich beispielsweise an einem aromatischen System mehrere Substituenten, so üben sie ihre M- und I-Effekte unabhängig voneinander aus und können einander verstärkend, aber auch gegen-



läufig in Bezug auf die Ladungsstabilisierung an einem bestimmten Atom wirken. In der Regel wirken mesomere Effekte stärker als induktive.

In der vorliegenden Erfindung werden daher bevorzugt solche ladungsstabilisierten Abgangsgruppen gewählt, bei denen eine Hydroxy- oder Thiogruppe an eines der Ringatome eines aromatischen, heteroaromatischen oder araliphatischen Systems gebunden ist oder an ein Kohlenstoffatom, welches mit dem Ringsystem verbunden ist, wobei die chemische Struktur des aromatischen, heteroaromatischen oder araliphatischen Systems so gewählt ist, dass die Summe der mesomeren und induktiven Effekte der enthaltenen funktionellen Gruppen einen Elektronenzug auf das Thiolat- oder Hydroxylat-Ion ausübt und auf diese Weise dessen negative Ladung stabilisiert.

Ein weiteres wichtiges Kriterium zur Quantifizierung der Abgangsgruppenqualität ist der  $pK_A$ -Wert einer chemischen Verbindung: Je höher der  $pK_A$ -Wert, desto schlechter ist die jeweilige Abgangsgruppe. CoA, Ppant und SNAC haben  $pK_A$ -Werte von 10 - 11, während Thiophenol einen  $pK_A$ -Wert von 8 aufweist. Es lässt sich somit sagen, dass Thiophenol seine mangelnde strukturelle Überstimmung zum natürlichen Phosphopanthethein-Kofaktor überraschend und im Widerspruch zum Stand der Technik durch seine hohe chemische Reaktivität überkompensieren kann, was auch für andere aromatische, heteroaromatische und ladungsstabilisierte araliphatische Thiol- und Hydroxyl-Verbindungen gilt. Dabei werden vorteilhaft solche ladungsstabilisierten aromatische, heteroaromatische und araliphatischen Thiol- und Hydroxyl-Verbindungen als Abgangsgruppen verwendet, deren  $pK_A$ -Wert kleiner oder gleich 10, bevorzugt kleiner oder gleich 8 ist. Die Ringsysteme der erfindungsgemäßen aromatischen, heteroaromatischen und araliphatischen Thiol- und Hydroxyverbindungen können durch einen oder mehrere Substituenten mit positiven oder negativen

induktiven oder mesomeren Effekte substituiert sein, wobei die Gesamtheit der Effekte aller vorhandenen Substituenten elektronenziehend und damit ladungsstabilisierend auf das bei der enzymatischen Zyklisierung frei gesetzte Thiolat- oder  
5 Hydroxylation wirkt.

Bei Verwendung von ladungsstabilisierten Thiol- und Hydroxyverbindungen zeigen auch solche Enzyme Zyklisierungsaktivität, die bei Verwendung der bisher bekannten Abgangsgruppen  
10 als inaktiv klassifiziert wurden (ca. 2/3 aller bisher untersuchten). Enzyme, die auch bei Verwendung von SNAC als Abgangsgruppe zyklisieren, zeigen verbesserte kinetische Eigenschaften mit bis zu 15 fach gesteigerten  $k_{cat}/K_M$  Werten bei gleich bleibender Regio- und Stereoselektivität, wenn Thiophenol-Derivate an Stelle von SNAC-Abgangsgruppen verwendet  
15 werden. Dies konnte am Beispiel des Surfactin-Thiophenols gezeigt werden (siehe Fig. 4). Surfactin zeigt ebenfalls verbesserte Reaktionsgeschwindigkeiten bei der Zyklisierung, wenn o-, m- oder p-Mercaptoanisol bzw. o-, m- oder p-Thiokresol als Abgangsgruppe verwendet werden.  
20

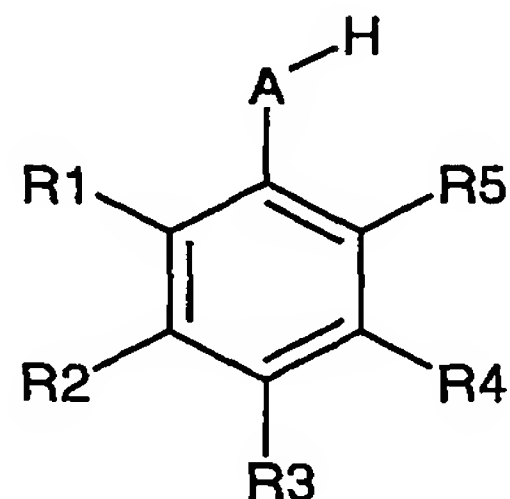
Die Katalyse von Peptid-Zyklasen lässt sich in zwei Teilschritte zerlegen:

- Der erste Teilschritt ist die Ausbildung des Peptidyl-O-TE-Intermediates durch Acylierung des aktivierten Ser-  
25 Restes der katalytischen Triade.
- Der zweite Teilschritt ist die Deacylierung des Ser-Restes durch eine funktionelle Gruppe der gebundenen Peptidkette als internes Nukleophil.

Thioestergebundene Abgangsgruppen können ausschließlich die  
30 katalytische Effizienz des ersten Teilschrittes beeinflussen: die Bildung des Peptidyl-O-TE-Intermediates. Experimente mit der neuen Abgangsgruppe Thiophenol bestätigen dies (siehe Fig. 4 bis Fig. 6). Eine Mutation im aktiven Zentrum des Enzyms zeigt keine Aktivität, was die abgangsgruppenbedingte

Acylierung und darauffolgende enzymatische Zyklisierung bestätigt.

Folgende aromatische, heteroaromatische und araliphatische  
5 Grundelemente dienen als ladungsstabilisierte Abgangsgruppen:



(I)

mit

A = O, S und

sowie R1, R2, R3, R4 und R5, die unabhängig voneinandersist:

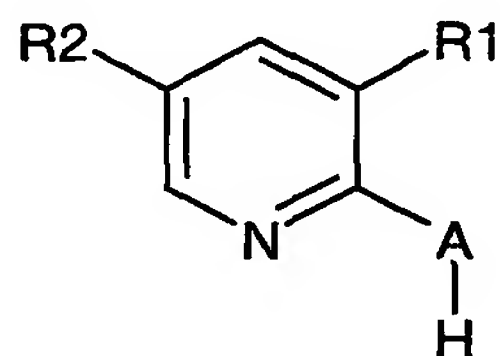
10 -NO<sub>2</sub>, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -CH<sub>2</sub>Cl, -SO<sub>3</sub>H, -H, -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, -NL<sub>3</sub><sup>+</sup>, -  
C(=O)L, -C(=O)Het, -O<sup>-</sup>, -NL<sub>2</sub>, -NH<sub>2</sub>, -OL, -OH, -NHC(=O)L, -  
OC(=O)L, -SL, -CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -  
Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl,  
-Heteroaryl,

15 wobei

L = -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Hetero-  
alkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl, wobei -Alkyl  
für eine Gruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen und -Alkenyl  
für eine einfach oder mehrfach ungesättigte Gruppe mit 2 bis  
20 Kohlenstoffatomen steht und -Alkyl bzw. -Alkenyl linear  
oder verzweigt sind, -Cycloalkyl und -Cycloalkenyl für eine  
Gruppe mit 3 bis 20 Kohlenstoffatomen steht, Heteroalkyl für  
eine Alkylgruppe steht, worin bis zu 5 Kohlenstoffatome  
ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel,  
25 Phosphor ersetzt sind, die heterocyclischen Gruppen für einen  
Rest mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen stehen, worin bis zu 5  
Kohlenstoffatome durch Heteroatome ausgewählt aus der Gruppe  
Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor ersetzt sind, Aryl  
für einen aromatischen Rest mit 5 bis 20 Kohlenstoffatomen

und Heteroaryl für einen entsprechenden aromatischen Rest steht, in dem bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome, ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor, ersetzt sind, wobei die Bedingungen so gewählt sind, dass bei Temperaturen unter 200 °C und Atmosphärendruck keine explosiven Stoffe entstehen und die Verbindung bestehend aus linearen Peptiden und daran gebundenen erfindungsgemäßen Abgangsgruppen bei diesen Bedingungen nicht hydrolytisch gespalten werden,

10



(II)

mit

A = O, S und

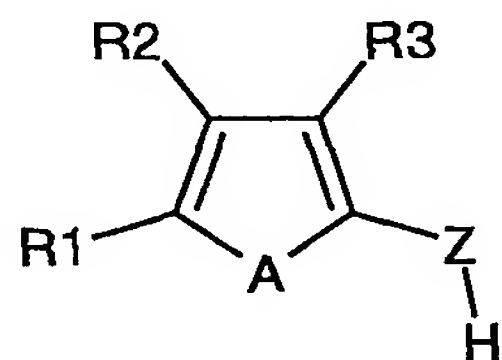
sowie R1 und R2, die unabhängig voneinander sind:

-NO<sub>2</sub>, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -CH<sub>2</sub>Cl, -SO<sub>3</sub>H, -H, -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, -NL<sub>3</sub><sup>+</sup>, -C(=O)L, -C(=O)Het, -O<sup>-</sup>, -NL<sub>2</sub>, -NH<sub>2</sub>, -OL, -OH, -NHC(=O)L, -OC(=O)L, -SL, -CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl,

wobei

L = -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl, wobei -Alkyl für eine Gruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen und -Alkenyl für eine einfach oder mehrfach ungesättigte Gruppe mit 2 bis 20 Kohlenstoffatomen steht und -Alkyl bzw. -Alkenyl linear oder verzweigt sind, -Cycloalkyl und -Cycloalkenyl für eine Gruppe mit 3 bis 20 Kohlenstoffatomen steht, Heteroalkyl für eine Alkylgruppe steht, worin bis zu 5 Kohlenstoffatome ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor ersetzt sind, die heterocyclischen Gruppen für einen Rest mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen stehen, worin bis zu 5

Kohlenstoffatome durch Heteroatome ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor ersetzt sind, Aryl für einen aromatischen Rest mit 5 bis 20 Kohlenstoffatomen und Heteroaryl für einen entsprechenden aromatischen Rest steht, in dem bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome, ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor, ersetzt sind, wobei die Bedingungen so gewählt sind, dass bei Temperaturen unter 200 °C und Atmosphärendruck keine explosiven Stoffe entstehen und die Verbindung bestehend aus linearen Peptiden und daran gebundenen erfindungsgemäßen Abgangsgruppen bei diesen Bedingungen nicht hydrolytisch gespalten werden, wobei dem Fachmann bekannt ist, dass Substituenten an C-4 oder C-6 des Pyridinringes keine Ladungsstabilisierung des an C-2 befindlichen Hydroxy- oder Thiol-Substituenten bewirken,



(III)

mit

A = O, S, und

Z = O, S,

sowie R1, R2, und R3, die unabhängig voneinander sind:

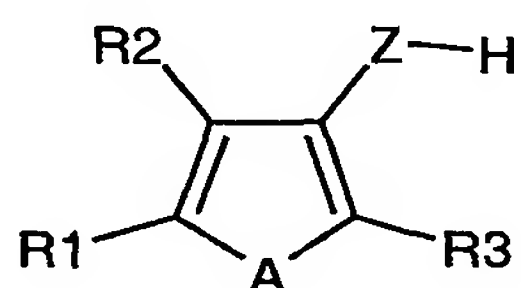
-NO<sub>2</sub>, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -CH<sub>2</sub>Cl, -SO<sub>3</sub>H, -H, -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, -NL<sub>3</sub><sup>+</sup>, -C(=O)L, -C(=O)Het, -O<sup>-</sup>, -NL<sub>2</sub>, -NH<sub>2</sub>, -OL, -OH, -NHC(=O)L, -OC(=O)L, -SL, -CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl,

wobei

L = -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl, wobei -Alkyl für eine Gruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen und -Alkenyl für eine einfach oder mehrfach ungesättigte Gruppe mit 2 bis 20 Kohlenstoffatomen steht und -Alkyl bzw. -Alkenyl linear



oder verzweigt sind, -Cycloalkyl und -Cycloalkenyl für eine Gruppe mit 3 bis 20 Kohlenstoffatomen steht, Heteroalkyl für eine Alkylgruppe steht, worin bis zu 5 Kohlenstoffatome ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor ersetzt sind, die heterocyclischen Gruppen für einen Rest mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen stehen, worin bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor ersetzt sind, Aryl für einen aromatischen Rest mit 5 bis 20 Kohlenstoffatomen und Heteroaryl für einen entsprechenden aromatischen Rest steht, in dem bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome, ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor, ersetzt sind, wobei die Bedingungen so gewählt sind, dass bei Temperaturen unter 200 °C und Atmosphärendruck keine explosiven Stoffe entstehen und die Verbindung bestehend aus linearen Peptiden und daran gebundenen erfindungsgemäßen Abgangsgruppen bei diesen Bedingungen nicht hydrolytisch gespalten werden,



(IV)

20 mit

A = O, S, und

Z = O, S,

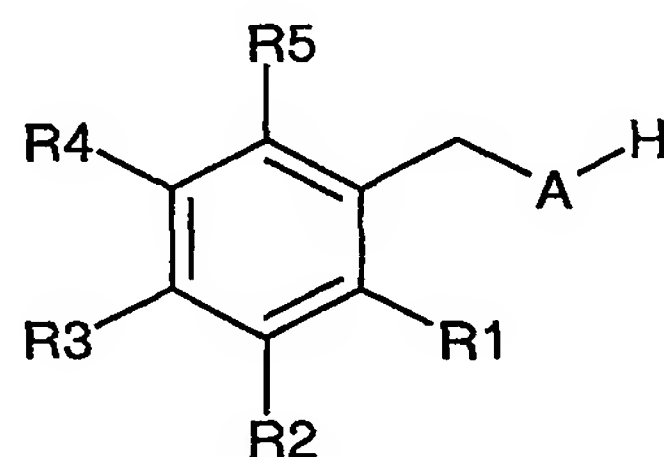
sowie R1, R2, und R3, die unabhängig voneinander sind:

-NO<sub>2</sub>, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -CH<sub>2</sub>Cl, -SO<sub>3</sub>H, -H, -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, -NL<sub>3</sub><sup>+</sup>, -C(=O)L, -C(=O)Het, -O<sup>-</sup>, -NL<sub>2</sub>, -NH<sub>2</sub>, -OL, -OH, -NHC(=O)L, -OC(=O)L, -SL, -CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl,

wobei

30 L = -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl, wobei -Alkyl

für eine Gruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen und -Alkenyl für eine einfach oder mehrfach ungesättigte Gruppe mit 2 bis 20 Kohlenstoffatomen steht und -Alkyl bzw. -Alkenyl linear oder verzweigt sind, -Cycloalkyl und -Cycloalkenyl für eine Gruppe mit 3 bis 20 Kohlenstoffatomen steht, Heteroalkyl für eine Alkylgruppe steht, worin bis zu 5 Kohlenstoffatome ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor ersetzt sind, die heterocyclischen Gruppen für einen Rest mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen stehen, worin bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor ersetzt sein können, Aryl für einen aromatischen Rest mit 5 bis 20 Kohlenstoffatomen und Heteroaryl für einen entsprechenden aromatischen Rest steht, in dem bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome, ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor, ersetzt sind, wobei die Bedingungen so gewählt sind, dass bei Temperaturen unter 200 °C und Atmosphärendruck keine explosiven Stoffe entstehen und die Verbindung bestehend aus linearen Peptiden und daran gebundenen erfindungsgemäßen Abgangsgruppen bei diesen Bedingungen nicht hydrolytisch gespalten werden,



(V)

mit

A = O, S und

sowie R1, R2, R3, R4 und R5, die unabhängig voneinander sind:  
 -NO<sub>2</sub>, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -CH<sub>2</sub>Cl, -SO<sub>3</sub>H, -H, -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, -NL<sub>3</sub><sup>+</sup>, -C(=O)L, -C(=O)Het, -O<sup>-</sup>, -NL<sub>2</sub>, -NH<sub>2</sub>, -OL, -OH, -NHC(=O)L, -OC(=O)L, -SL, -CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -

Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl,  
-Heteroaryl,

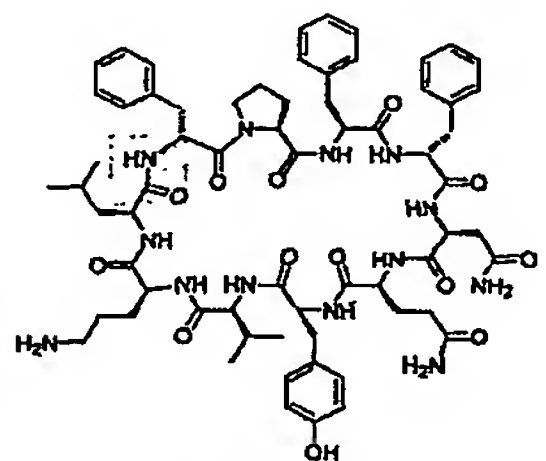
wobei

L = -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Hetero-  
5 alkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl, wobei -Alkyl  
für eine Gruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen und -Alkenyl  
für eine einfach oder mehrfach ungesättigte Gruppe mit 2 bis  
20 Kohlenstoffatomen steht und -Alkyl bzw. -Alkenyl linear  
oder verzweigt sind, -Cycloalkyl und -Cycloalkenyl für eine  
10 Gruppe mit 3 bis 20 Kohlenstoffatomen steht, Heteroalkyl für  
eine Alkylgruppe steht, worin bis zu 5 Kohlenstoffatome  
ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel,  
Phosphor ersetzt sind, die heterocyclischen Gruppen für einen  
Rest mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen stehen, worin bis zu 5  
15 Kohlenstoffatome durch Heteroatome ausgewählt aus der Gruppe  
Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor ersetzt sind, Aryl  
für einen aromatischen Rest mit 5 bis 20 Kohlenstoffatomen  
und Heteroaryl für einen entsprechenden aromatischen Rest  
steht, in dem bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome,  
20 ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel,  
Phosphor, ersetzt sind, wobei die Bedingungen so gewählt  
sind, dass bei Temperaturen unter 200 °C und Atmosphärendruck  
keine explosiven Stoffe entstehen und die Verbindung beste-  
hend aus linearen Peptiden und daran gebundenen erfindungsge-  
25 mäßigen Abgangsgruppen bei diesen Bedingungen nicht hydroly-  
tisch gespalten werden,

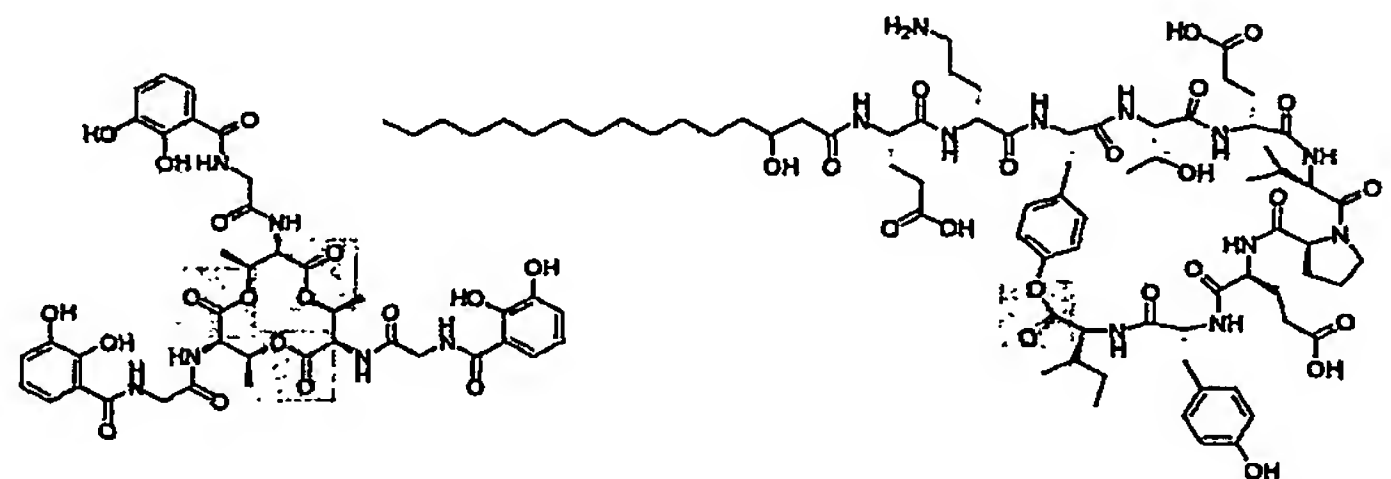
Des weiteren können diese Abgangsgruppen den natürlichen  
Kofaktor auch für andere artifizielle Reaktionen *in vitro* mit  
30 Enzymen der nichtribosomalen Peptidsynthetasen ersetzen. Eine  
solche Reaktion ist die Kondensationsreaktion zur Knüpfung  
einer Peptidbindung, katalysiert durch die Kondensationsdomä-  
ne (C-Domäne), die auch mit Thioester-gebundenen Substraten  
arbeitet.

Überraschend und im Widerspruch zum Stand der Technik wurde  
gefunden, dass die Erkennung eines Substrates durch das  
jeweilige Enzym keine Rolle spielt. Die vorliegende Erfindung  
5 stellt somit eine neue und für den Durchschnittsfachmann  
überraschende Weiterentwicklung des in der US 2002/0192773 A1  
beschriebenen Verfahrens zur enzymatischen Herstellung makro-  
zyklischer Moleküle dar, bei dem gereinigte isolierte Thi-  
oesterase-Domänen (TE-Domänen, Zyklasen) aus einem PKS- oder  
10 NRPS-Multidomänensystem mit einem Substrat umgesetzt werden.  
Bei den in Frage kommenden Substraten handelt es sich um  
lineare Peptide und Lipopeptide mit 5 - 22 monomeren Bauein-  
heiten wie z.B. Aminosäuren. Substrate sind beispielsweise  
Fengycin, Mycosubtilin, Bacillibactin, CDA, Surfactin, Ba-  
15 citracin oder Syringomycin und weitere Substrate, die bereits  
in US 2002/0192773 A1 beschrieben wurden, sowie Pristinamy-  
cin, wobei die genannten Substrate zusätzlich eine erfin-  
dungsgemäße Abgangsgruppe aufweisen. Einige dieser Substrate  
sind nachfolgend dargestellt:

20

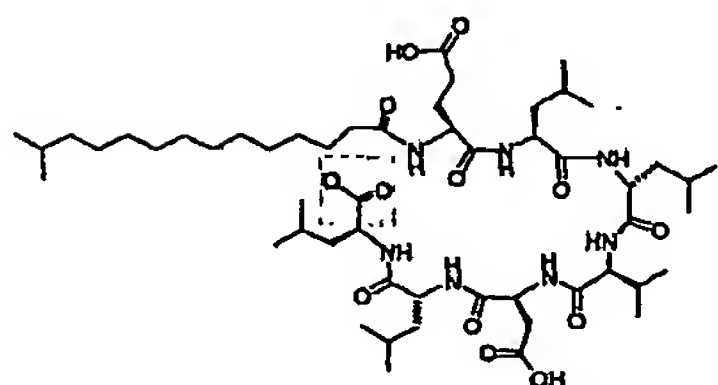


Tyrocidin (Antibiotikum)

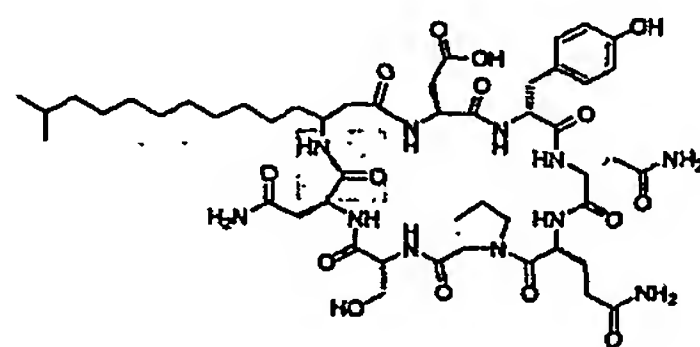


Bacillibactin (Siderophore)

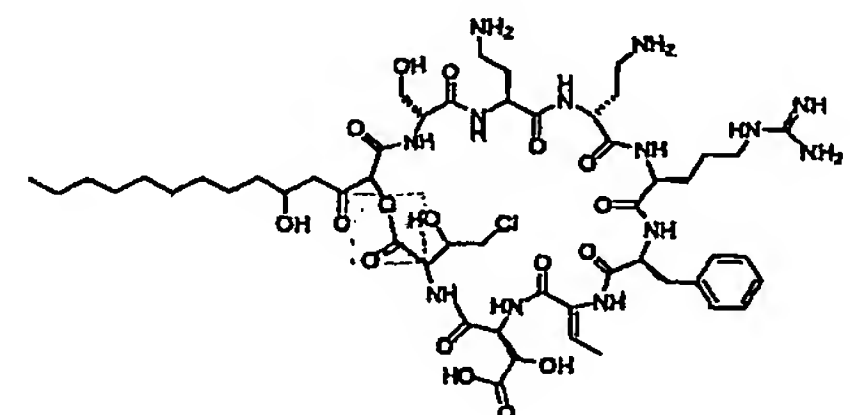
Fengycin (Antifungizid)



Surfactin (Surfactant)

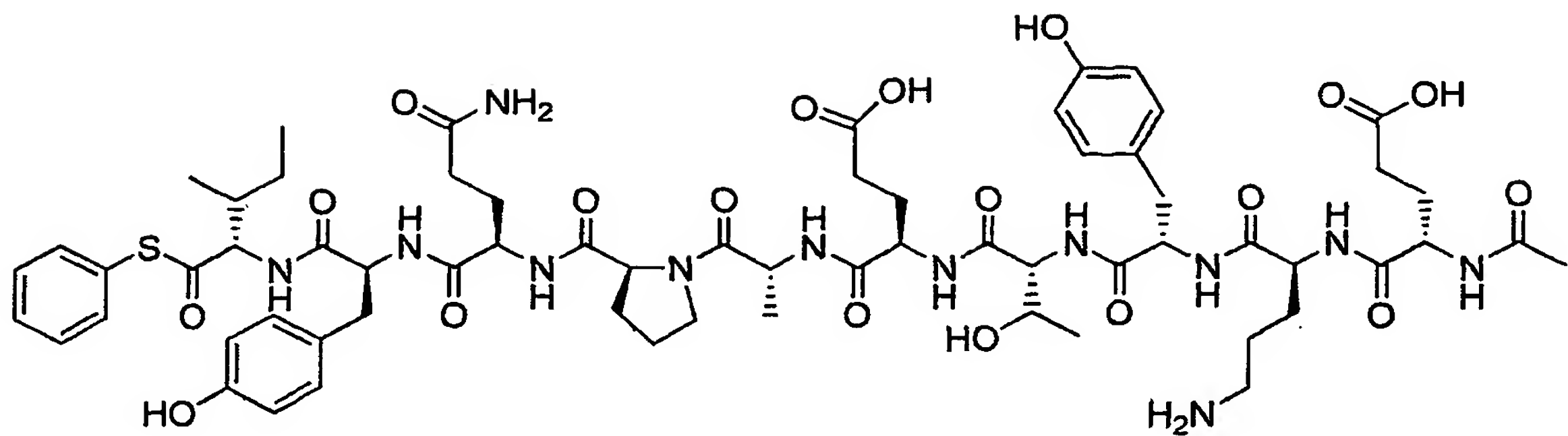


Mycosubtilin (Antifungizid)

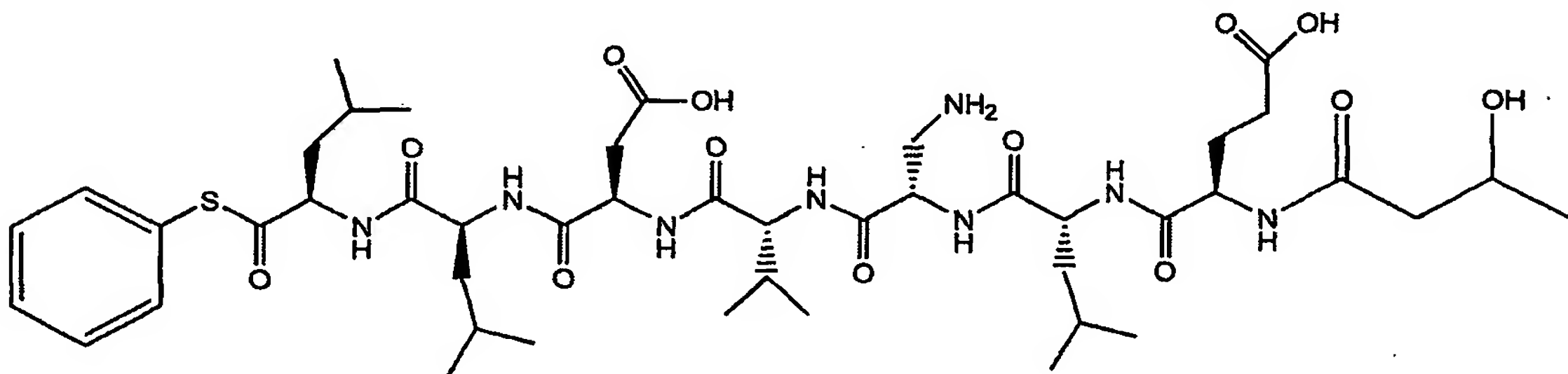


Syringomycin (Phytotoxin)

Bioaktive Peptide



Struktur eines Fengycin-Thiophenol Substrates



Struktur eines Surfactin-Thiophenol Substrates

5

Das erfindungsgemäße Verfahren stellt im Vergleich zum Stand der Technik auch bei solchen linearen Peptiden eine Verbesserung dar, die bereits mit dem Fachmann bekannten Methoden zyklisiert werden konnten, da das erfindungsgemäße Verfahren  
 10 die Reaktionsgeschwindigkeit der Zyklisierung beschleunigt und / oder zu höheren Ausbeuten des zyklischen Peptids führt.

Bei den in Frage kommenden Enzymen handelt es sich um gereinigte isolierte Thioesterase-Domänen oder Peptid-Zyklasen aus  
 15 NRPS- oder PKS-Systemen, wie beispielsweise den entsprechenden Domänen bzw. Zyklasen von Fengycin, Mycosubtilin, Bacillobactin, CDA, Surfactin, Bacitracin, Syringomycin, Tyrocidin, Pristinamycin und allen übrigen in US 2002/0192773 A1 aufgeführten Peptid-Zyklasen, Thioesterasen und gereinigten  
 20 isolierten Thioesterasen.

Das lineare Peptid enthält proteinogene und nicht-proteinogene Aminosäuren in seinem Rückgrat. Eingebettet in dieses Rückgrat können auch Reste und / oder funktionelle



Gruppen sein, die sich nicht von Aminosäuren ableiten wie z.B. gesättigte oder ungesättigte Kohlenstoff-Spacer. Die fakultativ in das Rückgrat eingebetteten Reste und /oder funktionellen Gruppen wurden bereits in US 2002/0192773 A1  
5 beschrieben. Die erfindungsgemäße Abgangsgruppe wird dabei entweder an der C-terminalen Carbonsäuregruppe oder einer Seitenketten-Carbonsäure angebracht.

Die erfindungsgemäße Abgangsgruppentechnologie kann zur  
10 Herstellung von Stoffbibliotheken für zyklische Peptide und Proteine verwendet werden, indem neue Substratvarianten strukturell bedeutsamer Moleküle (beispielsweise Fengycin, Mycosubtilin, Syringomycin, CDA, etc.), die bisher keine oder nur geringe Aktivität mit der herkömmlichen Abgangsgruppe  
15 SNAC zeigten, hergestellt und auf verbesserte biologische Eigenschaften (antibiotisch, antiviral, antifungal, cytostatisch) getestet werden. Die Substratvarianten werden durch kombinatorische Festphasenpeptidsynthese hergestellt und nach der oben aufgeführten allgemeinen Vorschrift mit den neuen  
20 Abgangsgruppen versehen. Bevorzugt wird dabei eine Stoffbibliothek für auf Zielzellen angepasste Peptidantibiotika hergestellt, wobei es sich um zyklische Peptidantibiotika handelt, die mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens hergestellt wurden.

25

Das erfindungsmäße Verfahren kann zur Herstellung von Zyklisierungs-Kits verwendet werden, die Mittel zur Kopplung erfindungsgemäßer ladungsstabilisierter Abgangsgruppen sowie Peptidzyklasen bereit stellen, so dass lineare Peptide mit  
30 den bereit gestellten Abgangsgruppen zunächst zu erfindungsgemäßen Substraten und anschließend mit den bereit gestellten Peptidzyklasen zu zyklischen Peptiden umgesetzt werden können. Dem Hersteller des erfindungsgemäßen Kits ist aus seinem

allgemeinen Wissen bekannt, wie er die einzelnen Komponenten des Kits, z.B. die Puffer, herstellt, formuliert und lagert.

Die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten zyklischen Peptide und Proteine können als Arzneimittel für Patienten zur Therapie, Diagnostik und Prophylaxe von Erkrankungen verwendet werden, bei denen bakterielle und / oder virale Infektionen auftreten. Die erfindungsgemäßen zyklischen Peptide und Proteine können, sofern sie cytostatische und /  
10 oder immunsuppressive Eigenschaften besitzen, ferner als Arzneimittel für Patienten zur Therapie, Diagnostik und Prophylaxe von Tumorerkrankungen sowie in der Transplantationsmedizin verwendet werden. Der Begriff Patient bezieht sich dabei gleichermaßen auf Menschen und Wirbeltiere. Damit  
15 können die Arzneimittel in der Human- und Veterinärmedizin verwendet werden. Pharmazeutisch akzeptable Kompositionen von Verbindungen gemäß den Ansprüchen können als Di- bis Oligomere oder als deren Salze, Ester, Amide oder „Prodrugs“ vorliegen, sofern sie nach zuverlässiger medizinischer Beurteilung  
20 keine übermäßige Toxizität, Irritationen oder allergische Reaktionen am Patienten auslösen. Die therapeutisch wirksamen Verbindungen der vorliegenden Erfindung können dem Patienten als Teil einer pharmazeutisch akzeptablen Komposition entweder oral, rektal, parenteral, intravenös, intramuskulär,  
25 subkutan, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, intravasculär, intrathekal, intravesikal, topisch, lokal (Puder, Salbe oder Tropfen) oder in Sprayform (Aerosol) verabreicht werden. Die intravenöse, subkutane, intraperitoneale oder intrathekale Gabe kann dabei kontinuierlich mittels einer Pumpe oder Dosiereinheit erfolgen. Dosierungsformen für die örtliche Administration der erfindungsgemäßen Verbindungen schließen Salben, Puder, Zäpfchen, Sprays und Inhalationsmittel ein. Die aktive Komponente wird dabei unter sterilen Bedingungen mit einem physiologisch akzeptablen

Trägerstoff und möglichen Preservativen, Puffern, Verdünnungs- und Treibmitteln je nach Bedarf vermischt.

## [Beispiele]

**Ausführungsbeispiel 1: Herstellung und Reinigung des Fengycin-Thiophenol-Substrates sowie Zyklisierung**

5 Das lineare Fengycin-Substrat wird zunächst nach Standardmethoden der Peptidfestphasensynthese hergestellt. Die Peptidsequenz lautet: Acetyl-Glu-D-Orn-Tyr-D-Thr-Glu-D-Ala-Pro-Gln-D-Tyr-Ile-COOH. Im nächsten Schritt werden 0,05 mMol des Peptides mit 0,1 mMol DCC, 0,1 mMol HOBt und 0,5 mMol Thiophenol versetzt und in 2 ml THF gelöst. Das Gemisch rührt  
10 für 30 min bei RT, und 0,05 mMol Kaliumkarbonat werden addiert. Das Gemisch rührt für weitere 2,5 h bei RT, und darauf wird durch Filtration festes DCH abgetrennt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die Entschützung der  
15 Peptidseitenketten erfolgt für 3 h in 2 ml 95% TFA, 2,5% Wasser und 2,5% Triisopropylsilan. Das Gemisch wird dann in 50 ml eiskalten Diethylether geschüttet und der entstehende Feststoff durch Zentrifugation abgetrennt. Die Reinigung des Feststoffs erfolgt mittels präparativer HPLC mit einer C<sub>18</sub>-  
20 Nucleodursäule (Porengröße 100 Å, Partikelgröße 7 µm, Durchmesser 10 mm, Länge 250 mm, Macherey-Nagel) mit einem Gradienten von 10% Acetonitril in Wasser/0,1 % TFA auf 70 % Acetonitril in Wasser/0,1% TFA in 40 min bei einer Flussrate von 6 ml/min. Die Retentionszeit des zyklisierten Fengycins  
25 (vgl. Fig. 1) beträgt 19 min. Die Ausbeute beträgt zwischen 70 und 80 %.

Die Produkte werden mit LC-MS und MALDI-TOF Massenspektrometrie auf Reinheit und Identität überprüft.

Die Zyklisierung des linearen Fengycin-Thiophenol-Substrates  
30 erfolgt in einem wässrigen Zyklisierungspuffer bestehend aus 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure (HEPES, 25 mM) und Natriumchlorid (NaCl, 50 mM) bei pH 7 in einem Gesamtvolumen von 50 µL. Die Substratkonzentration beträgt 100 µM für Standardzyklisierungsreaktionen. Die Zyklisie-

rungsreaktion wird durch Zugabe von rekombinanter Fengycin TE bei einer Endkonzentration von 5  $\mu\text{M}$  initiiert und durch Zugabe von 35  $\mu\text{L}$  4%-iger Trifluoressigsäure (TFA) in Wasser nach 4 Stunden gestoppt. Im Anschluss werden die Reaktions-  
5 produkte mittels HPLC mit einer  $\text{C}_{18}$ -Nucleodursäule (Porengröße 100 Å, Partikelgröße 3  $\mu\text{M}$ , Durchmesser 10 mm, Länge 250 mm, Macherey-Nagel) und einem Gradienten von 30 % Acetonitril in Wasser / 0,1 % TFA auf 60 % Acetonitril in Wasser / 0,1 % TFA in 35 min bei einer Flussrate von 0,4 mL/min bei 40 °C  
10 untersucht. Die Identität der Produkte wird durch ESI-Massenspektrometrie bestätigt. Zyklisiertes Fengycin kann mittels präparativer HPLC rein dargestellt werden.

**Ausführungsbeispiel 2: Herstellung und Reinigung des Fengycin-Benzylmercaptan-Substrates sowie Zyklisierung**

Herstellung, Reinigung und Zyklisierung des Fengycin-Benzylmercaptan-Substrates erfolgten analog zu Ausführungsbeispiel 1, wobei in Ausführungsbeispiel 2 0,05 mMol Benzylmercaptan an Stelle von 0,05 mMol Thiophenol eingesetzt  
20 werden. Die Ausbeute des zyklisierten Fengomycins beträgt etwa 70 %.

**Ausführungsbeispiel 3: Herstellung und Reinigung weiterer Fengycin- Substrate sowie Zyklisierung**

25 Fengycin wird wie unter Ausführungsbeispiel 1 und 2 beschrieben mit weiteren erfindungsgemäßen Abgangsgruppen umgesetzt. Dabei handelt es sich um 2-Mercaptopyridin, p-Nitrothiophenol und Pentafluorthiophenol. Die Zyklisierung dieser Fengycin-  
30 Substrate erfolgt analog zu Ausführungsbeispiel 1 und ergibt deutlich höhere Anteile an nicht enzymatisch katalysiertem Zyklisierungsprodukt bzw. hydrolysiertem Produkt als im Falle der Verwendung von Thiophenol bzw. Benzylmercaptan.



**Tabelle 1.**

Die linearen Peptide Fengycin, Surfactin, CDA und Syringomycin werden wie unter Ausführungsbeispiel 1 beschrieben mit Thiophenol umgesetzt und anschließend enzymatisch zyklisiert.

5 Tab. 1 zeigt die Ergebnisse der massenspektrometrischen Messung der erhaltenen erfindungsgemäßen Substrate.

Verbindung	Spezies	Ionisationsmethode	Beobachtete Masse (berechnete Masse) (Da)
Fengycin-Thiophenol	$[M+H]^+$	ESI	1361,40 (1361,60)
Surfactin-Thiophenol	$[M+H]^+$	ESI	965,40 (965,49)
CDA-Thiophenol	$[M+H]^+$	ESI	1519,30 (1519,5)
Syringomycin-Thiophenol	$[M+H]^+$	ESI	1175,60 (1175,54)

[Abbildungslegenden]

**Fig. 1: HPLC der Reaktion von Fengycin-Thiophenol mit der Fengycin-Peptidzyklase**

5

HPLC-MS mit einer reversed phase C<sub>18</sub> Nucleodur Säule (Macherey and Nagel, 250/3, Porendurchmesser:100 Å, Partikelgröße:3 µm) mit dem folgenden Gradienten: 0-35 min, 30-60 % Acetonitril/0.1 % TFA in Wasser/0.1 % TFA; 0.4 mL/min, 40°C.

10 1 zeigt die Kontrollreaktion mit einem mutierten (inaktivierten) Enzym. 2 zeigt die Inkubation mit dem nativen Enzym (aktiv). Su = Substrat, Cy = zyklisches Produkt, Hy = hydrolysiertes Produkt.

15 **Fig. 2: HPLC der Reaktion von Surfactin-Thiophenol mit der Surfactin-Peptidzyklase**

HPLC-MS mit einer reversed phase C<sub>18</sub> Nucleodur Säule (Macherey and Nagel, 250/3, Porendurchmesser:100 Å, Partikelgröße:3 µm) mit dem folgenden Gradienten: 0-35 min, 30-60 % Acetonitril/0.1 % TFA in Wasser/0.1 % TFA; 0.4 mL/min, 40°C.

20 1 zeigt die Kontrollreaktion ohne Enzym. 2 zeigt die Inkubation mit dem nativen Enzym (aktiv). Su = Substrat, Cy = zyklisches Produkt, Hy = hydrolysiertes Produkt, (Cy) nicht enzymatisch katalysierte Zyklisierung über eine Amino Seiten-  
25 gruppe in der Peptidsequenz an Position 3 (Dap).

**Fig. 3: Fengycin-Peptidzyklase**

5 µM der rekombinanten Fengycin-Peptidzyklase, die in vorhergehenden Untersuchungen keine Zyklisierungsaktivität mit konventionellen SNAC-Substraten zeigte, wird mit 100 µM Fengycin-Thiophenol für 10, 30, 40, 50, 60 min bei Raumtemperatur in 25 mM HEPES, 50 mM NaCl bei pH 7 in 50 µL Gesamtvolumen inkubiert. Mit dieser Messung wird der lineare Bereich

30

für weitere kinetische Studien ermittelt. Die Reaktionen werden durch Zugabe von 35  $\mu\text{L}$  TFA (4 % in Wasser) gestoppt und auf der analytischen HPLC mit einer  $\text{C}_{18}$ -Nucleodur Säule (Macherey and Nagel, 250/3, Porendurchmesser: 100 Å, Partikelgröße: 3  $\mu\text{m}$ ) mit dem folgenden Gradienten untersucht: 0-35 min, 30-60 % Acetonitril/0.1 % TFA in Wasser/0.1 % TFA; 0.4 mL/min, 40°C.

Kinetische Untersuchungen werden zu verschiedenen Zeitpunkten bei Substrat-Konzentrationen von 50  $\mu\text{M}$  bis 1000  $\mu\text{M}$  durchgeführt und die kinetischen Größen  $K_M$  und  $k_{\text{cat}}$  aus der Lineweaver-Burk-Auftragung entnommen. Für Fengycin-Thiophenol ergibt sich für die Zyklisierungsreaktion ein  $K_M$  von 461  $\mu\text{M}$  und ein  $k_{\text{cat}}$  von 0,33  $\text{min}^{-1}$ .

#### 15 **Fig. 4: Surfactin-Peptidzyklase**

Im Falle der Surfactin-Peptidzyklase existieren kinetische Referenzdaten mit einem SNAC-Substrat. Im Falle von Surfactin-Thiophenol wird für die Zyklisierungsreaktion ein  $K_M$  von 126  $\mu\text{M}$  und ein  $k_{\text{cat}}$  von 5,6  $\text{min}^{-1}$  bestimmt, was einem  $k_{\text{cat}}/K_M$  Wert von 0,04  $\mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$  entspricht. Verglichen damit ist die kinetische Effizienz von Surfactin-SNAC, repräsentiert durch den  $k_{\text{cat}}/K_M$  Wert 0,0029  $\mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$ , 14 mal niedriger als mit Surfactin-Thiophenol.

#### 25 **Fig. 5: CDA-Peptidzyklase**

Ein ähnliches Ergebnis erhält man für die Zyklisierung von CDA-Thiophenol mit der „Calcium Dependent Antibiotic“ Peptidzyklase (CDA). Der  $K_M$  Wert für das Thiophenol-Substrat beträgt 10,7  $\mu\text{M}$ , und der  $k_{\text{cat}}$  Wert beläuft sich auf 0,21  $\text{min}^{-1}$ . Die kinetische Effizienz des Thiophenol-Substrates mit einem  $k_{\text{cat}}/K_M$  Wert von 0,02  $\mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$  ist zehnfach größer verglichen mit dem  $k_{\text{cat}}/K_M$  Wert von dem SNAC Substrat ( $k_{\text{cat}}/K_M = 0,0021 \mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$ ).

**Fig. 6: Syringomycin-Peptidzyklase**

Im Falle der Syringomycin-Peptidzyklase existieren keine kinetischen Referenzdaten mit einem SNAC-Substrat, da dies in vorhergehenden Experimenten keine Aktivität zeigte. Im Falle von Syringomycin-Thiophenol wird für die Zyklisierungsreaktion ein  $K_M$  von 32,9  $\mu M$  und ein  $k_{cat}$  von 0,805  $\text{min}^{-1}$  bestimmt, was einem  $k_{cat}/K_M$  Wert von 0,024  $\mu M^{-1} \text{min}^{-1}$  entspricht.

**Fig. 7: HPLC der Reaktion von Surfactin-2-Thiokresol mit der Surfactin-Peptidzyklase**

HPLC-MS mit einer reversed phase  $C_{18}$  Nucleodur Säule (Macherey and Nagel, 250/3, Porendurchmesser:100 Å, Partikelgröße:3  $\mu m$ ) mit dem folgenden Gradienten: 0-35 min, 30-60 % Acetonitril/0.1 % TFA in Wasser/0.1 % TFA; 0.4 mL/min, 40°C. 1 zeigt die Kontrollreaktion mit einem mutierten (inaktivierten) Enzym. 2 zeigt die Inkubation mit dem nativen Enzym (aktiv). Su = Substrat, Cy = zyklisches Produkt, Hy = hydrolysiertes Produkt.

20

**Fig. 8: HPLC der Reaktion von Surfactin-4-Methoxyphenylthiol mit der Surfactin-Peptidzyklase**

HPLC-MS mit einer reversed phase  $C_{18}$  Nucleodur Säule (Macherey and Nagel, 250/3, Porendurchmesser:100 Å, Partikelgröße:3  $\mu m$ ) mit dem folgenden Gradienten: 0-35 min, 30-60 % Acetonitril/0.1 % TFA in Wasser/0.1 % TFA; 0.4 mL/min, 40°C. 1 zeigt die Kontrollreaktion mit einem mutierten (inaktivierten) Enzym. 2 zeigt die Inkubation mit dem nativen Enzym (aktiv). Su = Substrat, Cy = zyklisches Produkt, Hy = hydrolysiertes Produkt.

30

[Patentansprüche]

1. Verfahren zur Herstellung zyklischer Peptide, bei dem
- eine Peptidzyklase mit einem linearen Peptid in Kontakt  
5 gebracht wird,
  - das lineare Peptid einen Acylrest enthält, der durch eine chemisch mit diesem Acylrest verbundene nucleophile Abgangsgruppe aktiviert ist,
  - der aktivierte Acylrest des linearen Peptids das Zentrum  
10 der Peptidzyklase selektiv acyliert, wobei die nucleophile Abgangsgruppe unter Bildung des zyklischen Peptids abgespalten wird und
  - zyklische Peptide mit Ringen aus mindestens 5 Atomen gebildet werden,
- 15 dadurch gekennzeichnet, dass
- die nucleophile Abgangsgruppe, die mit dem Acylrest des linearen Peptids chemisch verbunden ist und diesen aktiviert, ladungsstabilisiert ist und
  - die ladungsstabilisierte Abgangsgruppe an die Acylgruppe  
20 der C-terminalen Carbonsäuregruppe des Peptids gebunden ist.
2. Verfahren zur Herstellung zyklischer Peptide gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den ladungsstabilisierten Abgangsgruppen um aromatische, hetero-  
25 aromatische oder araliphatische Verbindungen handelt, bei denen eine Hydroxy- oder Thiogruppe an eines der Ringatome oder an ein an das Ringsystem gebundenes Kohlenstoffatom gebunden ist.
3. Verfahren zur Herstellung zyklischer Peptide nach einem  
30 der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Peptidzyklase um eine NRPS- oder PKS-Zyklase handelt, bevorzugt um eine gereinigte isolierte Thioesterase-Domäne.



4. Verfahren zur Herstellung zyklischer Peptide nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass das lineare Peptid in seinem Rückgrat proteinogene und / oder nicht proteinogene Aminosäuren enthält, wobei in das Rückgrat auch Reste eingebettet sein können, die sich nicht von Aminosäuren ableiten.
- 5
5. Verfahren zur Herstellung zyklischer Peptide nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der ladungsstabilisierten Abgangsgruppe um eine
- 10 Verbindung der Formel



handelt, wobei gilt:

A = O, S

- 15 und wobei R1, R2, R3, R4 und R5 unabhängig voneinander sind:  
 -NO<sub>2</sub>, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -CH<sub>2</sub>Cl, -SO<sub>3</sub>H, -H, -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, -NL<sub>3</sub><sup>+</sup>, -C(=O)L, -C(=O)Het, -O<sup>-</sup>, -NL<sub>2</sub>, -NH<sub>2</sub>, -OL, -OH, -NHC(=O)L, -OC(=O)L, -SL, -CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl,  
 20 -Heteroaryl,

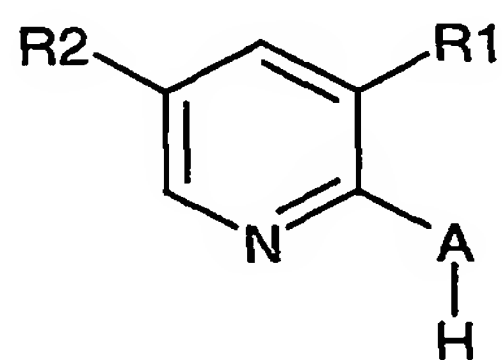
wobei

- L = -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl, wobei -Alkyl für eine Gruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen und -Alkenyl für eine einfach oder mehrfach ungesättigte Gruppe mit 2 bis 20 Kohlenstoffatomen steht und -Alkyl bzw. -Alkenyl linear oder verzweigt sind, -Cycloalkyl und -Cycloalkenyl für eine Gruppe mit 3 bis 20 Kohlenstoffatomen steht, Heteroalkyl für eine Alkylgruppe steht, worin bis zu 5 Kohlenstoffatome
- 25

ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor ersetzt sind, die heterocyclischen Gruppen für einen Rest mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen stehen, worin bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor ersetzt sind, Aryl für einen aromatischen Rest mit 5 bis 20 Kohlenstoffatomen und Heteroaryl für einen entsprechenden aromatischen Rest steht, in dem bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome, ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor, ersetzt sind.

6. Verfahren zur Herstellung zyklischer Peptide nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der ladungsstabilisierten Abgangsgruppe um eine Verbindung der Formel

15



(II)

handelt, wobei gilt:

A = O, S

und wobei R1 und R2 unabhängig voneinander sind:

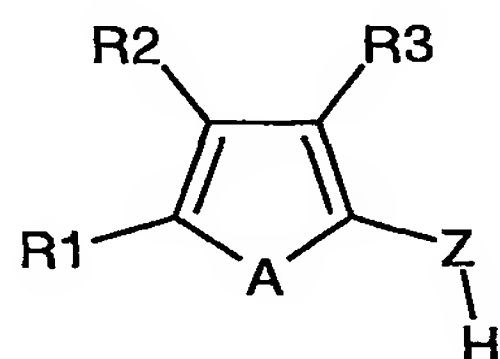
-NO<sub>2</sub>, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -CH<sub>2</sub>Cl, -SO<sub>3</sub>H, -H, -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, -NL<sub>3</sub><sup>+</sup>, -C(=O)L, -C(=O)Het, -O<sup>-</sup>, -NL<sub>2</sub>, -NH<sub>2</sub>, -OL, -OH, -NHC(=O)L, -OC(=O)L, -SL, -CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl,

25 wobei

L = -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl, wobei -Alkyl für eine Gruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen und -Alkenyl für eine einfach oder mehrfach ungesättigte Gruppe mit 2 bis 20 Kohlenstoffatomen steht und -Alkyl bzw. -Alkenyl linear

oder verzweigt sind, -Cycloalkyl und -Cycloalkenyl für eine Gruppe mit 3 bis 20 Kohlenstoffatomen steht, Heteroalkyl für eine Alkylgruppe steht, worin bis zu 5 Kohlenstoffatome ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor ersetzt sind, die heterocyclischen Gruppen für einen Rest mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen stehen, worin bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor ersetzt sind, Aryl für einen aromatischen Rest mit 5 bis 20 Kohlenstoffatomen und Heteroaryl für einen entsprechenden aromatischen Rest steht, in dem bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome, ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor, ersetzt sind.

7. Verfahren zur Herstellung zyklischer Peptide nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der ladungsstabilisierten Abgangsgruppe um eine Verbindung der Formel



(III)

handelt, wobei gilt:

A = O, S und

Z = O, S,

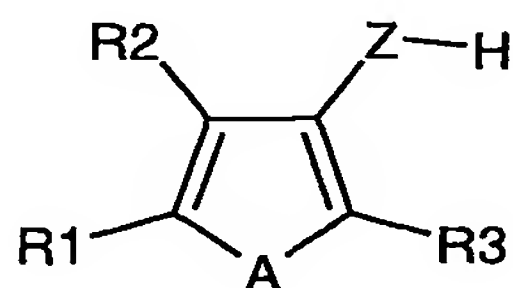
und wobei R1, R2, und R3 unabhängig voneinander sind:

-NO<sub>2</sub>, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -CH<sub>2</sub>Cl, -SO<sub>3</sub>H, -H, -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, -NL<sub>3</sub><sup>+</sup>, -C(=O)L, -C(=O)Het, -O<sup>-</sup>, -NL<sub>2</sub>, -NH<sub>2</sub>, -OL, -OH, -NHC(=O)L, -OC(=O)L, -SL, -CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl,

wobei

L = -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl, wobei -Alkyl für eine Gruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen und -Alkenyl für eine einfach oder mehrfach ungesättigte Gruppe mit 2 bis 20 Kohlenstoffatomen steht und -Alkyl bzw. -Alkenyl linear oder verzweigt sind, -Cycloalkyl und -Cycloalkenyl für eine Gruppe mit 3 bis 20 Kohlenstoffatomen steht, Heteroalkyl für eine Alkylgruppe steht, worin bis zu 5 Kohlenstoffatome ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor ersetzt sind, die heterocyclischen Gruppen für einen Rest mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen stehen, worin bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor ersetzt sind, Aryl für einen aromatischen Rest mit 5 bis 20 Kohlenstoffatomen und Heteroaryl für einen entsprechenden aromatischen Rest steht, in dem bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome, ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor, ersetzt sind.

8. Verfahren zur Herstellung zyklischer Peptide nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der ladungsstabilisierten Abgangsgruppe um eine Verbindung der Formel



(IV)

25

handelt, wobei gilt:

A = O, S und

Z = O, S,

und wobei R1, R2, und R3 unabhängig voneinander sind:

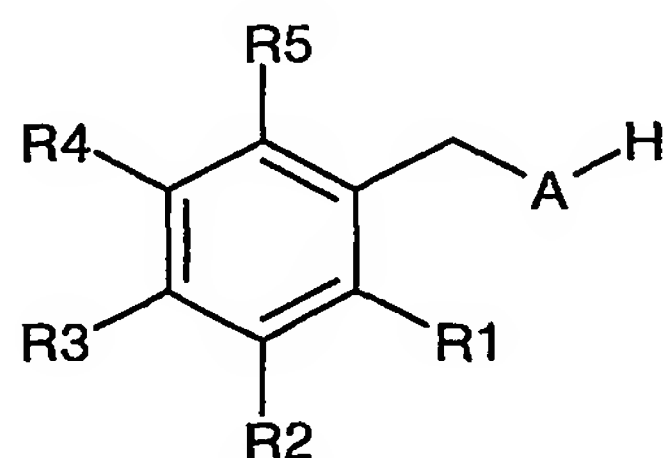
-NO<sub>2</sub>, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -CH<sub>2</sub>Cl, -SO<sub>3</sub>H, -H, -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, -NL<sub>3</sub><sup>+</sup>, -C(=O)L, -C(=O)Het, -O<sup>-</sup>, -NL<sub>2</sub>, -NH<sub>2</sub>, -OL, -OH, -NHC(=O)L, -

OC(=O)L, -SL, -CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl,

wobei

- 5 L = -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl, wobei -Alkyl für eine Gruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen und -Alkenyl für eine einfach oder mehrfach ungesättigte Gruppe mit 2 bis 20 Kohlenstoffatomen steht und -Alkyl bzw. -Alkenyl linear  
10 oder verzweigt sind, -Cycloalkyl und -Cycloalkenyl für eine Gruppe mit 3 bis 20 Kohlenstoffatomen steht, Heteroalkyl für eine Alkylgruppe steht, worin bis zu 5 Kohlenstoffatome ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor ersetzt sind, die heterocyclischen Gruppen für einen  
15 Rest mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen stehen, worin bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor ersetzt sind, Aryl für einen aromatischen Rest mit 5 bis 20 Kohlenstoffatomen und Heteroaryl für einen entsprechenden aromatischen Rest  
20 steht, in dem bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome, ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor, ersetzt sind.

9. Verfahren zur Herstellung zyklischer Peptide nach einem  
25 der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der ladungsstabilisierten Abgangsgruppe um eine Verbindung der Formel



(V)



handelt, wobei gilt:

A = O, S

und wobei R1, R2, R3, R4 und R5 unabhängig voneinander sind:

-NO<sub>2</sub>, -CN, -F, -Cl, -Br, -I, -CH<sub>2</sub>Cl, -SO<sub>3</sub>H, -H, -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, -NL<sub>3</sub><sup>+</sup>,  
5 -C(=O)L, -C(=O)Het, -O<sup>-</sup>, -NL<sub>2</sub>, -NH<sub>2</sub>, -OL, -OH, -NHC(=O)L, -  
OC(=O)L, -SL, -CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -  
Cycloalkenyl, -Heteroalkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl,  
-Heteroaryl,

wobei

10 L = -Alkyl, -Alkenyl, -Cycloalkyl, -Cycloalkenyl, -Hetero-  
alkyl, -Heterocycloalkyl, -Aryl, -Heteroaryl, wobei -Alkyl  
für eine Gruppe mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen und -Alkenyl  
für eine einfach oder mehrfach ungesättigte Gruppe mit 2 bis  
20 Kohlenstoffatomen steht und -Alkyl bzw. -Alkenyl linear  
15 oder verzweigt sind, -Cycloalkyl und -Cycloalkenyl für eine  
Gruppe mit 3 bis 20 Kohlenstoffatomen steht, Heteroalkyl für  
eine Alkylgruppe steht, worin bis zu 5 Kohlenstoffatome  
ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel,  
Phosphor ersetzt sind, die heterocyclischen Gruppen für einen  
20 Rest mit 1 bis 20 Kohlenstoffatomen stehen, worin bis zu 5  
Kohlenstoffatome durch Heteroatome ausgewählt aus der Gruppe  
Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel, Phosphor ersetzt sind, Aryl  
für einen aromatischen Rest mit 5 bis 20 Kohlenstoffatomen  
und Heteroaryl für einen entsprechenden aromatischen Rest  
25 steht, in dem bis zu 5 Kohlenstoffatome durch Heteroatome,  
ausgewählt aus der Gruppe Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel,  
Phosphor, ersetzt sind.

10. Verfahren zur Herstellung eines Substrates und anschlie-  
30 ßende Umsetzung dieses Substrates mit Peptid-Zyklasen zu  
einem zyklischen Peptid, wobei die Substrate lineare Pep-  
tide sind, dadurch gekennzeichnet, dass nacheinander fol-  
gende Schritte ausgeführt werden:

- Versetzen der freien Peptidsäure mit einem den C-Terminus der Peptidsäure aktivierenden Reagenz, einem Kupplungsadditiv und einer ladungsstabilisierten Abgangsgruppe in einem Lösungsmittel
- 5     - Rühren bei Raumtemperatur,
- Zugabe einer Base und weiteres Rühren bei Raumtemperatur,
- Filtrieren,
- Entfernen des Lösungsmittels,
- 10    - Entschützen des Peptids,
- Zugabe einer Peptid-Zyklase,
- Reinigung des erhaltenen zyklischen Peptids.
- 11. Verfahren zur Herstellung eines Substrates und anschließende Umsetzung dieses Substrates mit Peptid-Zyklasen zu
- 15    einem zyklischen Peptid gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Acylgruppe der C-terminalen Aminosäure des linearen Peptids an eine Abgangsgruppe nach einem der Ansprüche 5 bis 9 gebunden ist.
- 12. Verfahren zur Herstellung eines Substrates und anschließende Umsetzung dieses Substrates mit Peptid-Zyklasen zu
- 20    einem zyklischen Peptid gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Abgangsgruppe einen  $pK_A$ -Wert kleiner oder gleich 10, bevorzugt kleiner oder gleich 8 besitzt.
- 13. Verfahren zur Herstellung eines Substrates und anschließende Umsetzung dieses Substrates mit Peptid-Zyklasen zu
- 25    einem zyklischen Peptid gemäß nach einem der Ansprüche 10 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass als Aktivierungsreagenz für den freien C-Terminus oder eine Seitenketten-Carbonsäure der Peptidcarbonsäure DCC, DCI, PyClop, HBTU,
- 30    HATU, HOSu, TBTU, T3P, BopCl oder 3-Cl-1-Pyridiniumiodid verwendet wird.
- 14. Verfahren zur Herstellung eines Substrates und anschließende Umsetzung dieses Substrates mit Peptid-Zyklasen zu

einem zyklischen Peptid gemäß einem der Ansprüche 10 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass als Kupplungsadditiv HOBT, HOAT oder HONB verwendet wird.

15. Verwendung von zyklischen Peptiden gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14 zur Herstellung eines Medikamentes zur Therapie, Diagnostik und Prophylaxe von Erkrankungen, bei denen bakterielle Infektionen auftreten.
16. Verwendung von ladungsstabilisierten Abgangsgruppen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14 in einem Kit zur Herstellung zyklischer Peptide.

Fig. 1:

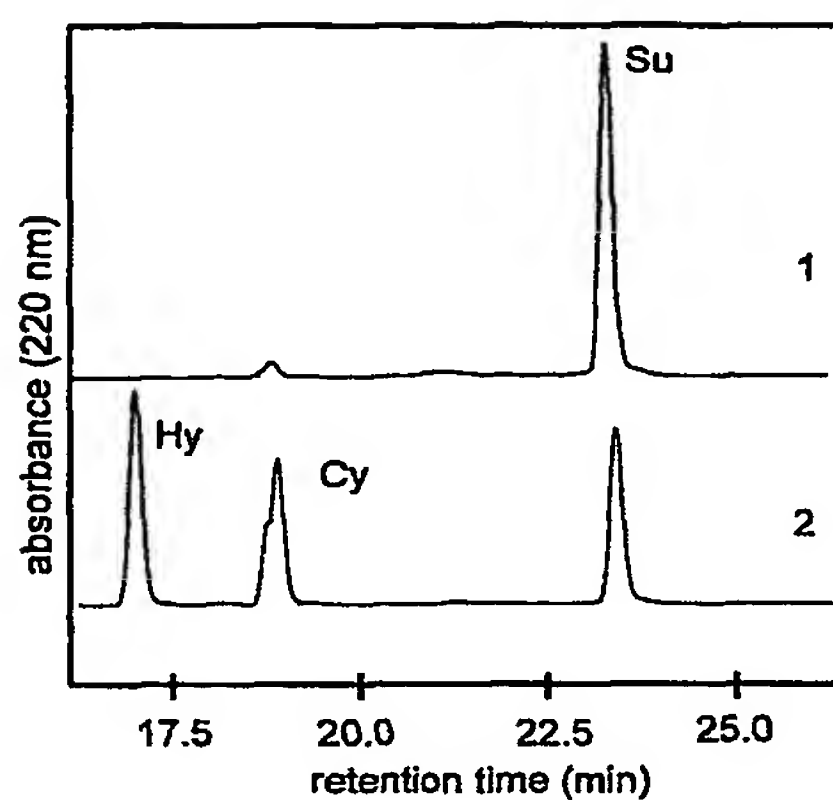


Fig. 2:

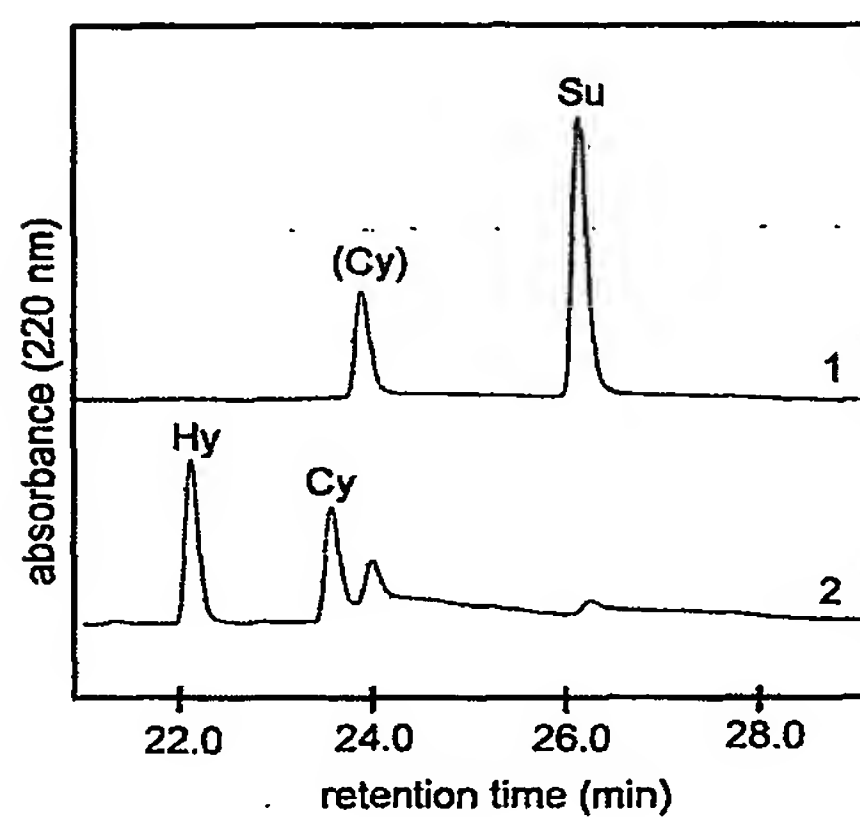


Fig. 3:

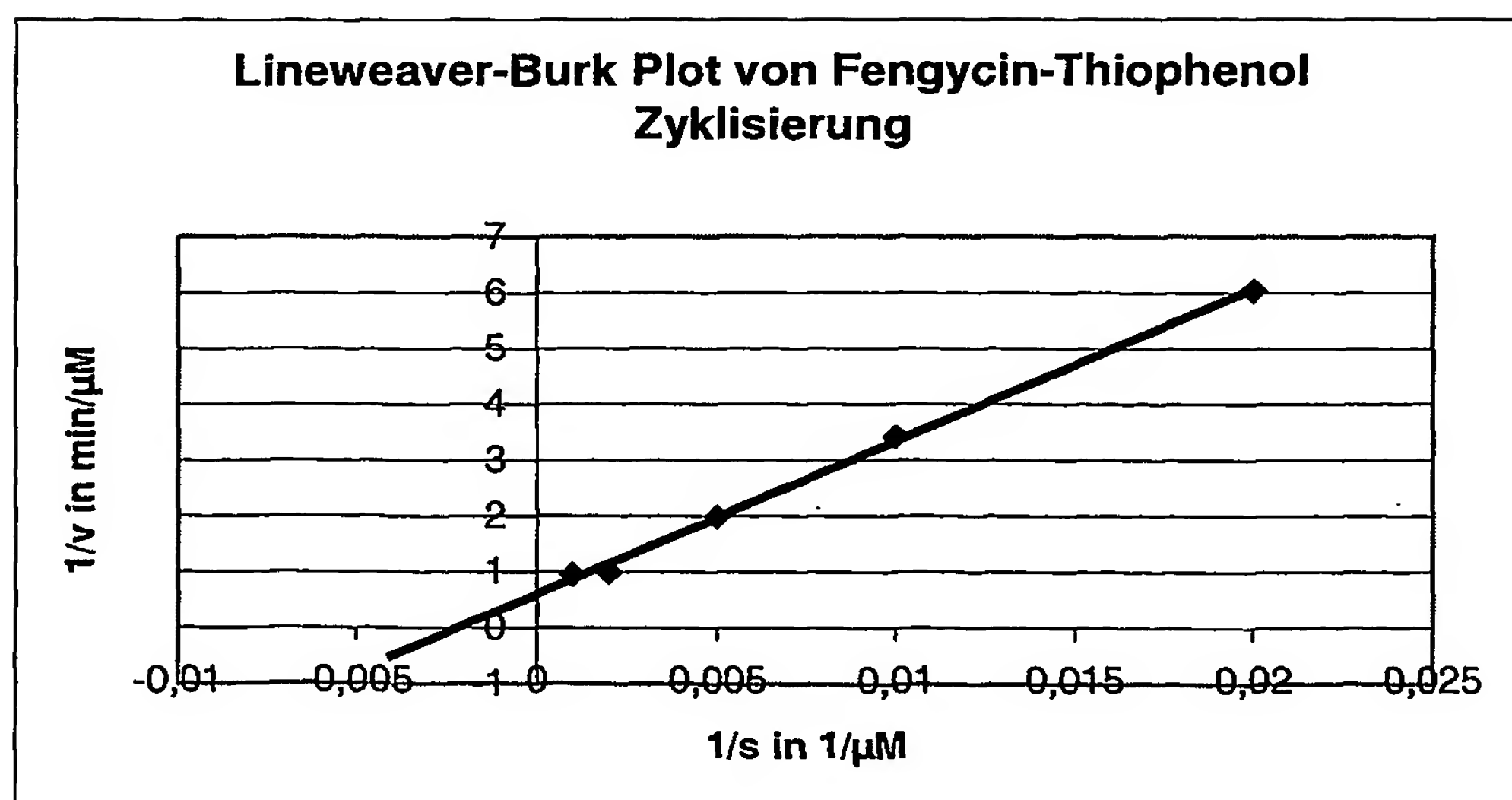


Fig. 4:

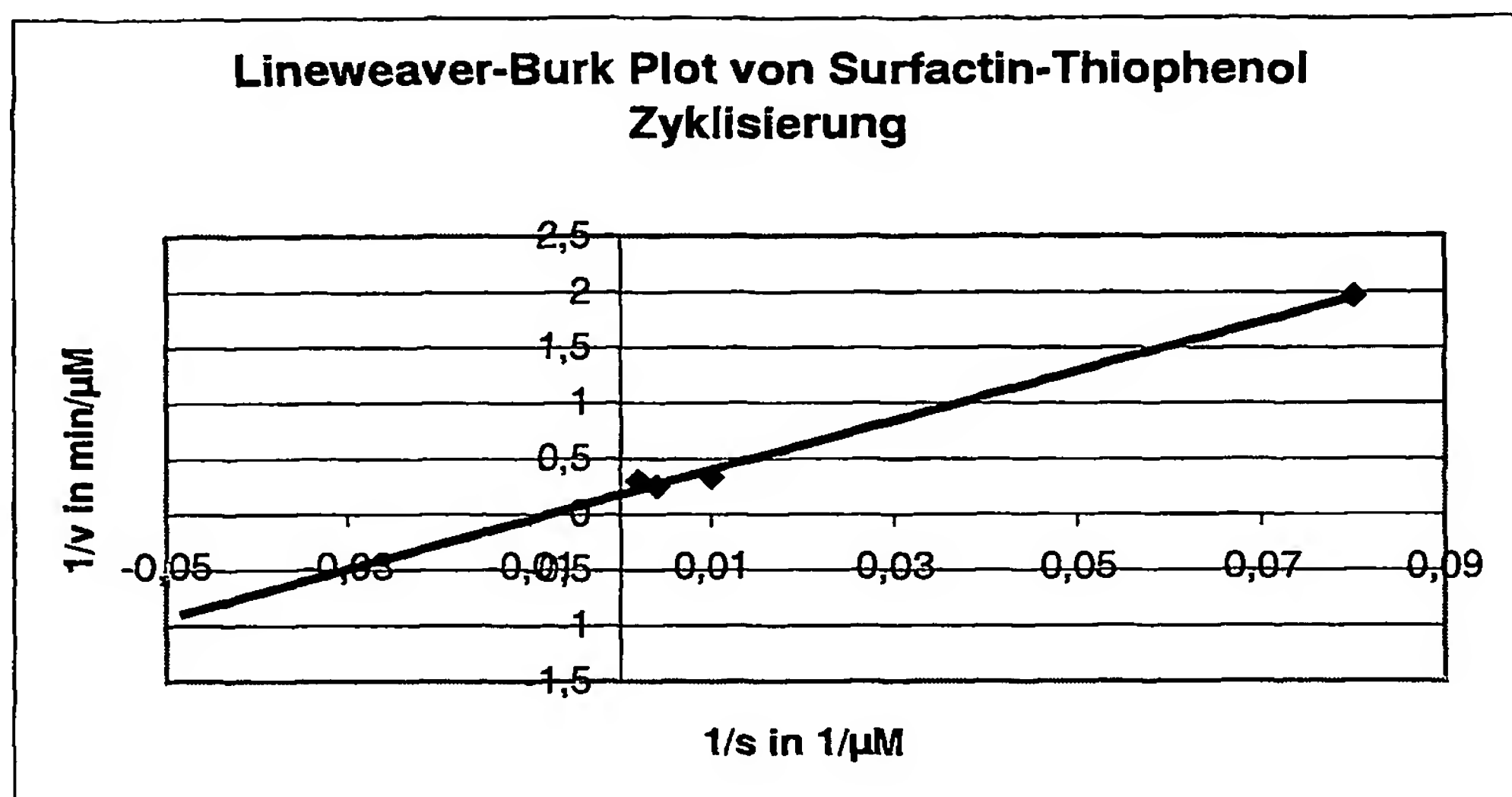


Fig. 5:

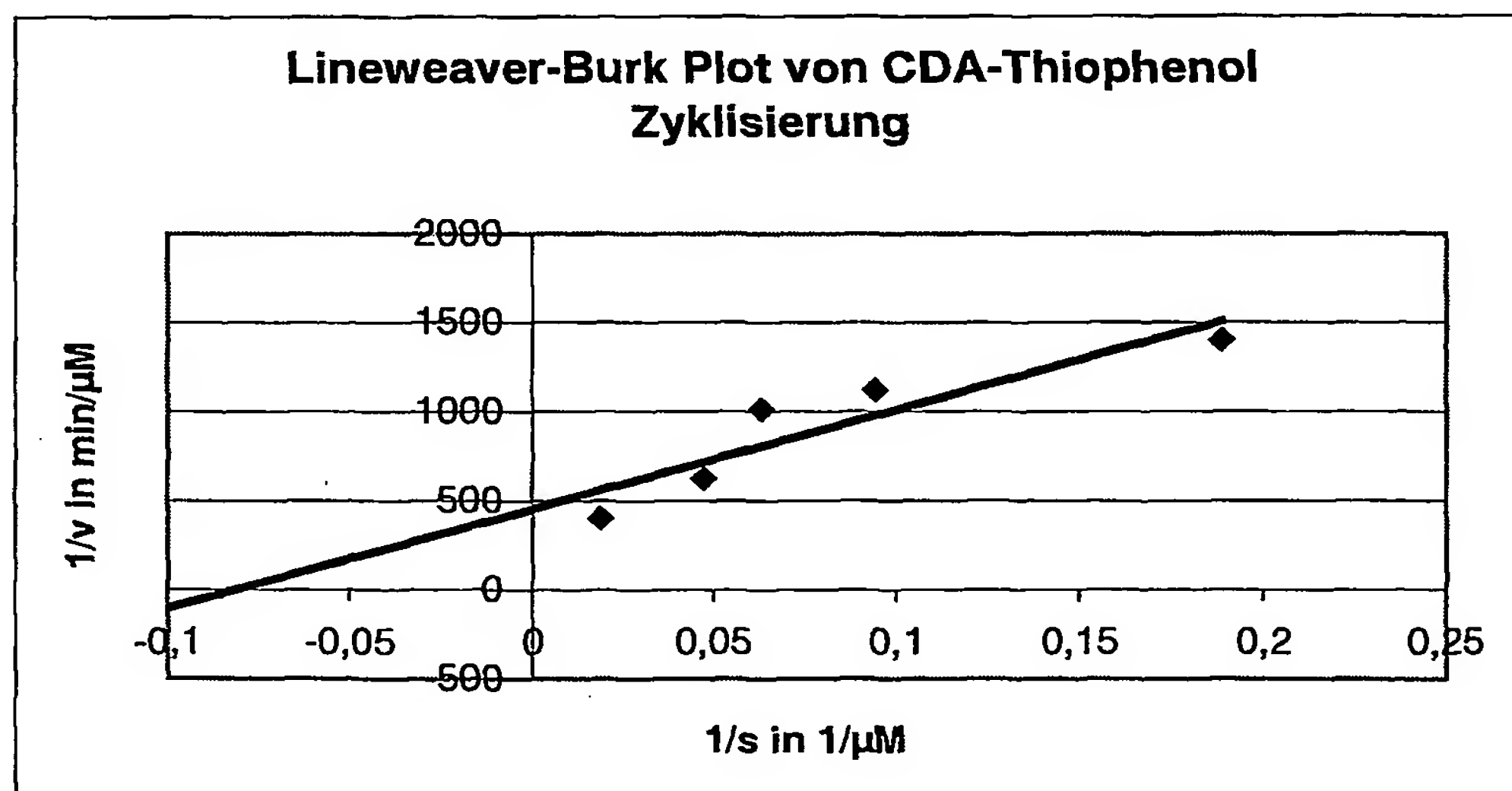




Fig. 6:

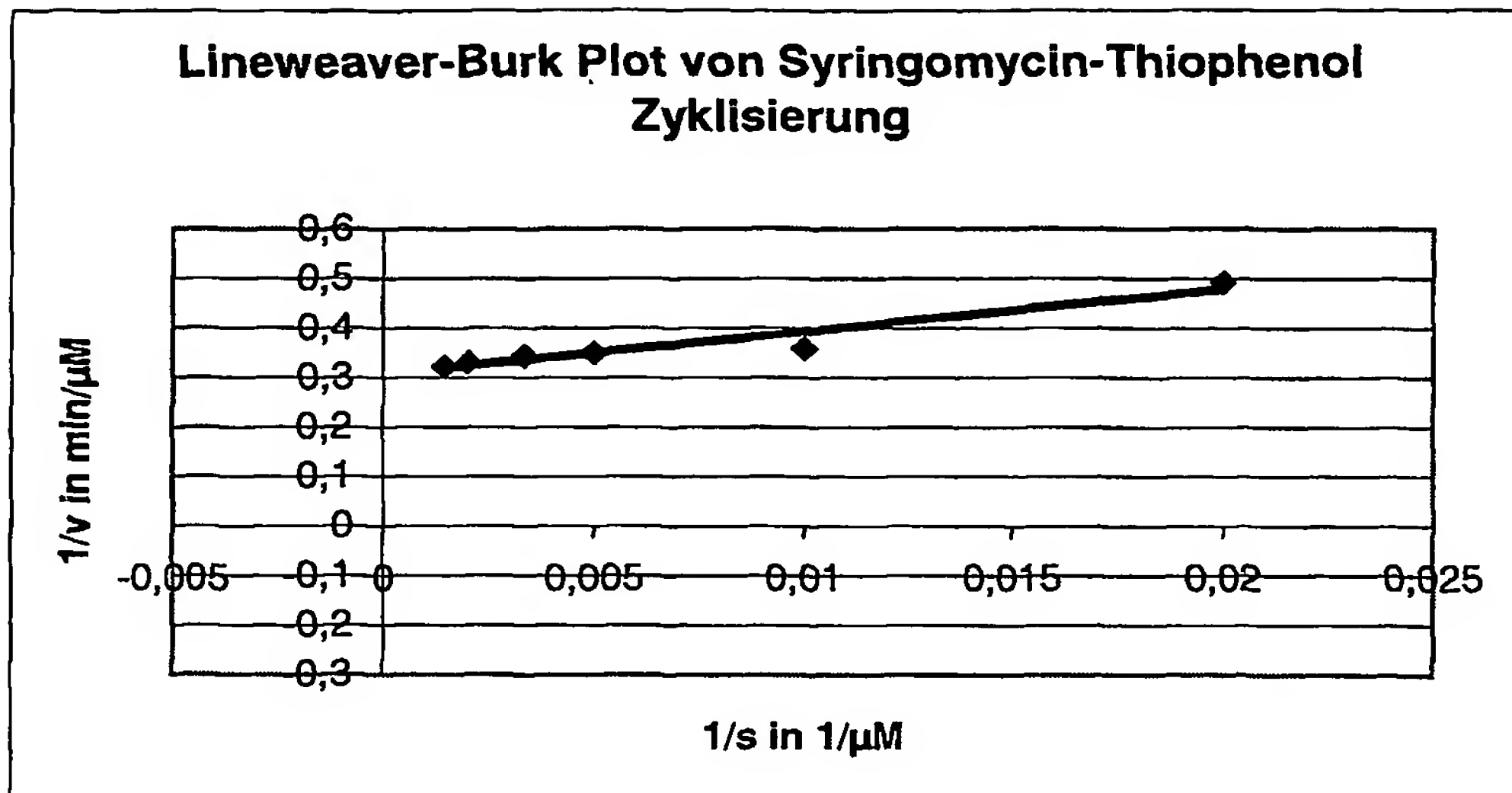


Fig. 7:

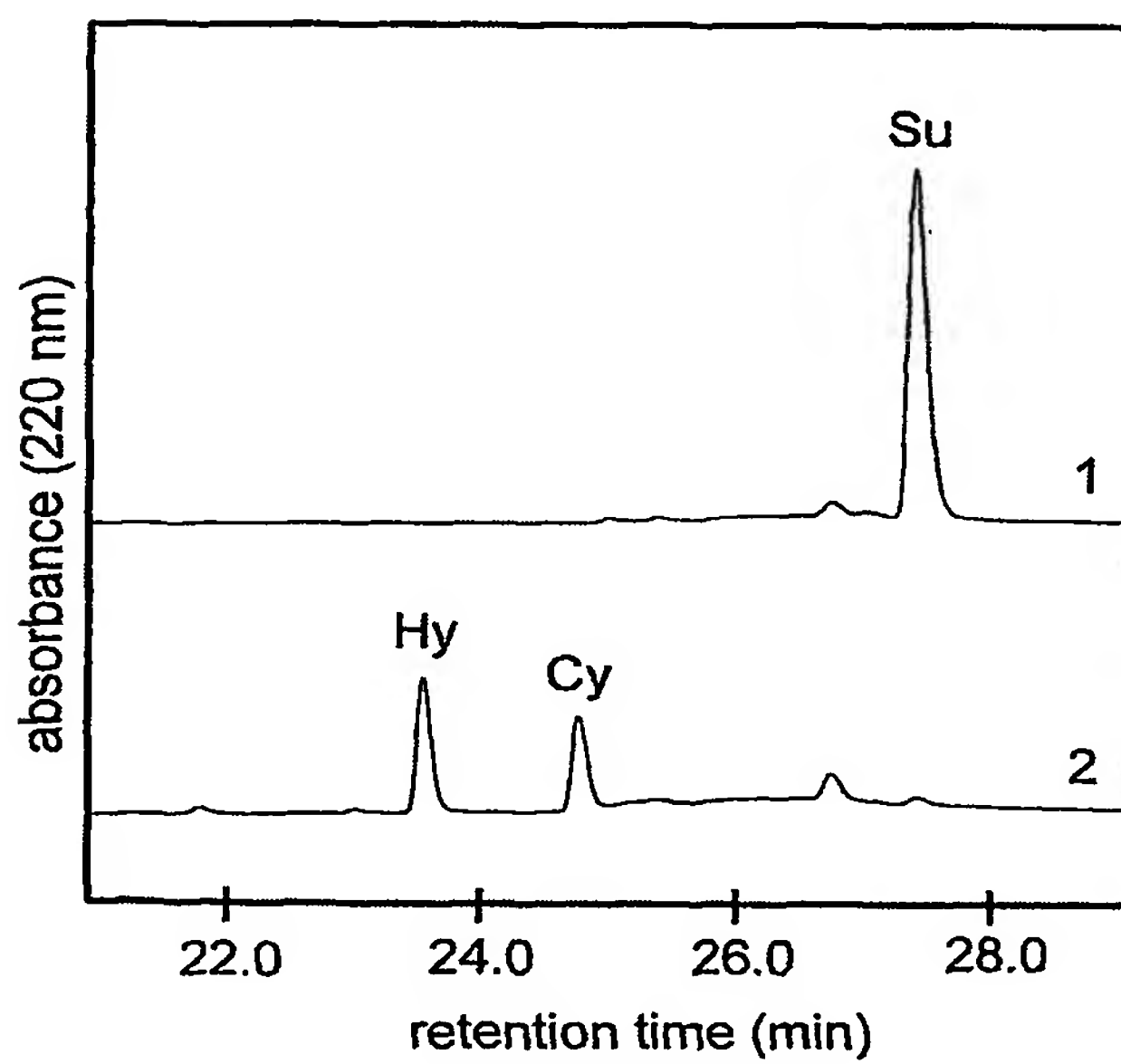


Fig. 8:

